



我が国が侵入を警戒しているミバエの効果的かつ効率的な侵入定着防止技術に関する研究

著者	上地 俊久
発行年	2020
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2019
報告番号	12102甲第9478号
URL	http://doi.org/10.15068/00160468

我が国が侵入を警戒しているミバエの効果的かつ効率的な
侵入定着防止技術に関する研究

2020 年 1 月

上地 俊久

我が国が侵入を警戒しているミバエの効果的かつ効率的な
侵入定着防止技術に関する研究

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生物圏資源科学専攻
博士（農学）学位論文

上地 俊久

目次

第 1 章	序論	1
第 2 章	輸入植物検疫で発見されるミバエ卵の生死判定時間短縮に役立つ 分析法検討のための ATP 量分析	
2.1	緒言	7
2.2	材料および方法	
2.2.1	供試虫	9
2.2.2	卵の孵化率	10
2.2.3	ATP 量分析に供試した無処理卵または殺虫処理卵	12
2.2.4	ATP 量分析	17
2.2.5	孵化率および ATP 量の解析	19
2.3	結果	
2.3.1	孵化率	20
2.3.2	無処理卵または殺虫処理卵の ATP 量	20
2.4	考察	24
第 3 章	ベトナム産セグロモモミバエの発育零点・有効積算温度および 侵入定着リスクが高い地域の推定	
3.1	緒言	36
3.2	材料および方法	
3.2.1	供試虫	40
3.2.2	生存率，発育期間および産卵前期間	41
	の調査を実施した人工気象装置	

3.2.3	卵の生存率および発育期間の調査	41
3.2.4	幼虫の生存率および発育期間の調査	41
3.2.5	蛹の生存率および発育期間の調査	42
3.2.6	産卵前期間の調査	42
3.2.7	データの解析	42
3.3	結果	
3.3.1	生存率	44
3.3.2	発育期間および産卵前期間	45
3.3.3	T_0 , K および R^2	46
3.3.4	発育・生殖可能月および年間発生世代数の推定	46
3.4	考察	46
第4章	セグロモミバエ雄の性成熟および齢に関係した β -カリオフィレン またはメチルオイゲノールへの反応	
4.1	緒言	57
4.2	材料および方法	
4.2.1	供試虫	59
4.2.2	雄の性成熟日齢	60
4.2.3	雄日齢とトラップへの誘引の関係	62
4.2.4	データの解析	62
4.3	結果および考察	63

第 5 章 誘引剤使用トラップによる雄捕獲がセグロモミバエの交尾抑制 に及ぼす効果	
5.1 緒言	72
5.2 材料および方法	
5.2.1 供試虫	72
5.2.2 CAR または ME 使用簡易トラップでの	73
雄捕獲による交尾抑制効果	
5.2.3 データの解析	75
5.3 結果および考察	76
第 6 章 総合考察	88
概要	97
Summary	100
謝辞	104
本研究の公表論文	106
引用文献	108

第1章 序論

病害虫が未発生であった国・地域に侵入し、農林業に深刻な被害を与えた事例が数多くある（舟木, 2015; 横井, 2016）。1914年に開始された我が国の植物検疫は、現在、日本の植物防疫法に基づき実施されており、有用な植物を害する病害虫の侵入定着・まん延を防止することにより、我が国における農業生産の安全・安定に重要な役割を果たしている。近年、国際貿易が活発になり、海上・航空輸送および低温での流通管理技術の発達により我が国に輸入される植物の種類・数量が大幅に増加し、さらに地球温暖化による諸外国における病害虫の分布拡大等の要因により、病害虫が侵入するリスクは年々高まっている。

我が国が侵入を警戒している病害虫の中でも、特にミバエ科昆虫は経済的に非常に重要な害虫を含む分類群である（Drew and Romig, 2013; White and Elson-Harris, 1992）。ミバエは他国から我が国に持ち込まれた果実の輸入植物検疫で頻繁に発見されている。このため、経済的に重要なミバエの我が国への侵入リスクは急速に高まっていると考えられる。例えば、経済的に重要なミバエが我が国に侵入定着した場合、国内生産への被害が生じ、国内外の移動制限措置が講じられる可能性がある。かつて最重要害虫のミカンコミバエ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Fig. 1.1) が小笠原諸島および南西諸島に、同じく最重要害虫のウリミバエ *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) が南西諸島に発生していたため、これらの地域で生産された寄主植物の移動は制限または禁止されていた。そこで、国家規模のプロジェクトが開始され、長い歳月、莫大な費用および膨大な労力をかけて、1985年に小笠原諸島のミカンコミバエがまず根絶された。続いて、1986年に南

西諸島のミカンコミバエが、最終的には、1993年に南西諸島のウリミバエが根絶された。小笠原諸島および南西諸島のミカンコミバエ根絶防除事業には、18年の歳月が費やされ、人件費を除く総額50億円の直接防除費および延べ19万2千人が投じられた。そして、南西諸島のウリミバエの根絶防除事業には、22年の歳月が費やされ、人件費を除く直接防除費204億円および延べ44万人が投じられた（吉澤,1993）。近年、ミカンコミバエが一時的に我が国の一部地域に再侵入し、関係者に衝撃を与えた。これを受けて、本種に対する植物検疫措置として国内外への果実流通規制等が実施された。2015年、本種が奄美大島に侵入した際には、根絶のための緊急防除の実施に伴い寄主果実であるカンキツ類等の移動が規制された。そして、本土に奄美大島特産のポンカン、タンカン等を出荷できない事態が生じた（農林水産省植物防疫所,2016a）。2015年および2017年、本種が我が国に侵入した際には、韓国政府が我が国からの寄主植物の輸入を停止する事態も生じた（農林水産省植物防疫所,2016b；2019a）現在、本種は根絶され輸入停止は解除されている。

多くの島からなる日本は周囲を海に囲まれているとはいえ、侵入害虫の脅威にさらされていると言っても過言ではない。とりわけ経済的に重要なミバエの侵入は大きな脅威となる。これらのミバエの侵入が生じないようにするため次に挙げる技術を確立することが重要であると考えられる。第一に、経済的に重要なミバエの我が国への侵入を確実に防止するための輸入植物検疫における効果的・効率的な検査に係る技術である。我が国に輸入される植物の種類・数量は、近年、大幅に増加している。このため、輸入植物検疫手続きの一層の迅速化が求められており、これらの要請にも応じていかなければならない。このような状況

を踏まえ、検査の有効性に着目するだけでなく迅速さ、すなわち、効率性にも着目しなければならない。第二に、重要なミバエが我が国に侵入した場合に備えた早期に侵入が発見できる効果的な侵入警戒調査に係る技術である。なお、侵入警戒調査でも効率性が求められることは言うまでもない。第三に、万が一、重要なミバエが我が国に侵入・定着を果たした場合に備えた効果的かつ効率的な根絶防除に係る技術である。

本研究ではこれらの技術の確立、つまり、我が国が侵入を警戒しているミバエの効果的かつ効率的な侵入定着防止技術の確立を目的とした。本目的のために開発すべきこと、または明らかにすべきこととして、まず、輸入植物検疫で発見されるミバエ卵の确实かつ迅速な生死判定法、次に、侵入警戒調査・根絶防除の根拠となる重要ミバエの発育零点・有効積算温度ならびに日本各地における発育・生殖可能月および年間発生世代数、最後に、侵入警戒調査・根絶防除に有効な重要ミバエの誘引剤、が挙げられる。

我が国の輸入植物検疫では殺虫処理された果実から発見されるミバエ卵の生死判定に長時間を要している。そこで、第2章では、効果的・効率的な侵入防止技術確立のための調査を行った。生死判定時間短縮に役立つ分析法検討のため、短時間で実施可能なミバエ卵の ATP 量分析を行い、検疫における本分析の適用可能性を考察した。本分析には、ミカンコミバエの無処理卵または完全殺虫処理（低温処理、温湯浸漬処理をシミュレートした急速加熱処理または蒸熱処理をシミュレートした低速加熱処理）卵が供試された。なお、本分析の適用要件は完全殺虫処理卵の ATP 量が無処理卵より少ないことである。第3章では、我が国への侵入能力が高いと考えられ、かつ経済的に重要な害虫であるベトナム産セ

グロモモミバエ *Bactrocera correcta* (Bezzi) (Fig. 1.2) を供試して、本種の効果的・効率的な侵入定着防止技術、すなわち、侵入警戒調査・根絶防除の確立に必要なパラメータである発育零点 (T_0) および有効積算温度 (K) を推定した。そして、本パラメータに基づき日本各地における本種の発育・生殖可能月および年間発生世代数を推定した。第4章では、セグロモモミバエの効果的・効率的な侵入定着防止技術、すなわち、根絶防除のための雄除去法および侵入警戒調査のためのモニタリングトラップ調査に有効な誘引剤開発のための調査を行った。まず、本種の雄性成熟日齢を調査した。次に、近年の報告で本種の誘引物質であることが明らかになった β -カリオフィレン (CAR) または本種の誘引剤としてこれまで使用されてきたメチルオイゲノール (ME) を使用したトラップにおける各日齢の雄捕獲率を調査した。根絶防除技術としての雄除去法による根絶成功の要件は雄が交尾前に誘引剤に反応することであり、雄除去法に有効な誘引剤は上述の侵入警戒調査にも有効である可能性が高い。第5章では、第4章の試験結果を考慮の上、セグロモモミバエの雄除去法における CAR の有効性をさらに明らかにするための調査を行った。本種雄および未交尾雌ならびに採卵容器を入れた実験室内ケージにおける CAR または ME 使用トラップでの雄捕獲による交尾抑制効果を、産卵された卵の受精状況を調査することで比較した。最後に、第6章では、上述の結果を考慮して総合考察を行った。



Fig. 1.1 *Bactrocera dorsalis*



Fig. 1.2 *Bactrocera correcta*

第2章 輸入植物検疫で発見されるミバエ卵の生死判定時間短縮に役立つ

分析法検討のための ATP 量分析

2.1 緒言

ミカンコミバエ種群，ウリミバエ，クインスランドミバエ *Bactrocera tryoni* (Froggatt) およびチチュウカイミバエ *Ceratitis capitata* (Wiedemann) のような経済的に重要な種が分布する地域から日本に向けての寄主植物の輸入は，日本の植物防疫法によって禁止されている。しかし，経済的に重要なミバエの寄主果実で重要ミバエの完全殺虫処理が確立された場合，濃密な防除が行われている生産地で生産され，適切に完全殺虫処理された果実については，二国間の協議・合意後，公聴会，植物防疫法関係法令改正等の手続きを経て，その果実の日本への輸入は解禁される。なお，これらの完全殺虫処理は，輸出国において，または輸出国から日本への輸送中に実施される。すでに確立された完全殺虫処理には，低温処理 [例：台湾産ポメロ *Citrus maxima* (Burm.) Merr. およびイスラエル産レモン *Citrus limon* (L.) Burm. f.]，温湯浸漬処理（例：ペルーおよびブラジル産マンゴウ *Mangifera indica* L.）ならびに蒸熱処理（例：ハワイ産パパイヤ *Carica papaya* L. および台湾産マンゴウ）がある（農林水産省植物防疫所, 2019b）。

ミバエの卵は我が国の輸入植物検疫で時折発見される。その場合，処理施設の欠陥，ヒューマンエラー等に起因する殺虫処理の失敗等について考慮する必要がある。すなわち，何らかの原因で殺虫処理の失敗等が生じた場合，その失敗等のため適切に殺虫処理されなかった孵化能力のある生卵を検出しなければならない。しかし，ミバエの生卵と検疫で発見される完全殺虫処理された死卵

の形態は通常同一であるため、生卵と死卵の形態差のみによる卵の生死判定は困難である。このため、殺虫処理された果実からミバエの疑いのある卵が発見された場合、当該卵は、孵化に要する期間、つまり、2日程度、適切な温度で保管後、孵化の有無が確認される。その間、処理果実の輸入植物検疫手続きは停止される。このため、果実の輸入関係者は、検疫手続きにおける本保管期間短縮のため迅速な生死判定法の開発を望んでいる。

生物は生体内でアデノシン三リン酸（ATP）を生産する（Atkinson, 1965; Pradet and Raymond, 1983）。生物の死後、ATP は ATP 分解酵素によって急速に分解される（Bendall, 1951; Forney et al., 1991）。そのため、生きた生物と死んだ生物の生体内における ATP 量差が生死判定に利用できる場合がある。実際に、この ATP 量差に基づく生死判定が微生物汚染の有無を調査するために利用されている（Fujinami et al., 2004; 間瀬ら, 2010）。また、これまでフラーバラゾウムシ *Pantomorus cervinus* (Boheman) 卵、リンゴハダニ *Panonychus ulmi* (Koch) 卵またはナミハダニ *Tetranychus urticae* Koch 成虫を供試して、生きた生物と死んだ生物における ATP 量差を調査した結果が報告されている（海老名ら, 2004; Ebina and Ohto, 2007; Forney et al., 1991）。これらの節足動物における ATP 量分析は3つの工程、すなわち、①虫体の破砕、②ATP の抽出および③ATP 存在下でルシフェリンとルシフェラーゼが発光する反応を利用した ATP 量の測定、から成り立っている。そして、これらの工程は、通常1時間以内で完了するため、孵化の有無が確認されるまでに通常2日程度を要する上述の検疫で発見されたミバエ卵の保管調査よりも短時間で完了する。さらに、本分析によって ATP 量という定量的な結果が得られる。しかし、Forney et al. (1991) は、フラーバラゾウムシに

において、凍結殺虫処理卵の ATP 量は、処理後、急速に減少した一方、55℃での温湯浸漬殺虫処理卵または臭化メチルくん蒸殺虫処理卵は、凍結殺虫処理卵ほど急速に減少しなかったことを報告した。そのため、殺虫処理方法によって処理後の節足動物生体内における ATP 量の減少割合は異なることが推定される。また、海老名ら（2004）は、フラーバラゾウムシ卵の ATP 量が卵齢の進行に伴い減少することを報告した。逆に、Phillips et al. (2015) は、イエバエ *Musca domestica* Linnaeus 卵の ATP 量が卵齢の進行に伴い増加したことを報告した。これらの報告に基づくと、卵齢の違いによって昆虫卵の ATP 量は異なっている可能性が高い。そこで、本研究では、経済的に重要なミバエであるミカンコミバエの卵を供試した ATP 量分析を行うことによって、卵齢、殺虫処理方法および処理後の経過時間ごとの卵内における ATP 量の増減を調査した。そして、確実かつ迅速な輸入植物検疫手続きを確立するためミバエ卵の生死判定法としての ATP 量分析の適用可否を検討した。なお、本分析の適用要件は完全殺虫処理卵の ATP 量が無処理卵より少ないことである。

2.2 材料および方法

2.2.1 供試虫

小笠原諸島の野外で採集後、農林水産大臣の特別許可を得て（許可番号 59Y-1301）、横浜植物防疫所調査研究部で累代飼育しているミカンコミバエを供試した。本種は、かつて小笠原諸島を含む日本の一部地域に発生していたが、現在、日本から根絶されている（吉澤, 1993; Yoshizawa, 1997）。本種は野外で採集された後、横浜植物防疫所調査研究部の飼育施設（KOITOTRON-PCSH-2SP, Koito

Electric Industries, Japan) 内に設置された大型スクリーンケージ (30×30×60cm) で飼育され、一定条件 (温度: 26±1℃, 相対湿度: 60±10%, 光周期: 明期 14 時間および暗期 10 時間, 薄明薄暮期: 明期の最初と最後の 1 時間) で維持された。

幼虫には、人工飼料として、水 150mL, 35%塩酸 0.25mL, *p*-ヒドロキシ安息香酸メチル 0.1g, ソルビン酸 0.1g, 乾燥酵母 (Asahi Food & Healthcare, Japan) 5g, 砂糖 7.5g, トイレットペーパー5g および小麦ふすま 37.5g の混合物を与えた。成虫には、加水分解酵母 (AY-65, Asahi Food & Healthcare, Japan) とグラニュー糖を 1:4 の割合で混合したものを与え、給水のために水寒天 (寒天粉末 48 g: 水道水 5L) を与えた。

採卵は本種を累代飼育している大型スクリーンケージ内に小型採卵容器を 30 分間設置して行われた。小型採卵容器は、35mm フィルムケースの側面に黄色のテープを巻き、その側面に 15 のピンホール (直径約 0.5mm) を開け、側面にレモンジュース (Pokka lemon, Pokka Sapporo Food & Beverage, Japan) を塗付し、本ケース内に少量のレモンジュースを入れて蓋をしたものを使用した。そして、無処理卵ならびに殺虫処理、すなわち、凍結処理 (freezing), 低温処理 (cold treatment), 急速加熱 (rapid heating) 処理および低速加熱 (slow heating) 処理した卵の孵化率調査および ATP 量分析を行った (後述)。

2.2.2 卵の孵化率

2.2.2.1 無処理卵の孵化率

佐伯ら (1980) の報告によると 25℃におけるミカンコミバエ卵の平均孵化期

間は 1.71 日であった。そこで、孵化の有無を確認するため直径 9cm のガラスシャーレ内に水で湿らせた濾紙を置き、その上に敷いたガーゼに採卵直後（採卵後 30 分以内）の 300 卵を置き、蓋をした。次に、26℃に設定した飼育施設で 3 日間維持した後、孵化した卵数を確認した。

2.2.2.2 24 時間 5℃で維持された 0, 4 および 24 時間齢卵の孵化率

最初に、直径 9cm のガラスシャーレ内に水で湿らせた濾紙を置き、その上に敷いたガーゼに採卵直後の 300 卵を置き、蓋をした。次に、26℃に設定した飼育施設で、0 時間（0 時間齢）（すなわち、保管を行っていないことを示す）、4 時間（4 時間齢）、または 24 時間（24 時間齢）、卵を保管した。続いて、これらを 5℃に設定したバイオマルチインキュベーターで 24 時間保管した後、孵化の有無を確認するため 26℃に設定した飼育施設で 3 日間維持した。そして、孵化した卵数を確認した。

2.2.2.3 凍結処理、低温処理、急速加熱処理または低速加熱処理を行った卵の孵化率

最初に、直径 9cm のガラスシャーレ内に水で湿らせた濾紙を置き、その上に敷いたガーゼに採卵直後の卵を置き、蓋をした。次に、26℃に設定した飼育施設で、0 時間（0 時間齢）（すなわち、保管を行っていないことを示す）、4 時間（4 時間齢）、または 24 時間（24 時間齢）、卵を保管した。その後、以下に記載した方法で、これらに凍結処理、低温処理、急速加熱処理または低速加熱処理を行った。急速加熱処理または低速加熱処理前の卵については、50μL の蒸留水を入れ

たポリプロピレンチューブに浸漬し、サーマルサイクラーにそのチューブをセットした後に急速加熱処理または低速加熱処理を行った。次に、26℃に設定した飼育施設内に急速加熱処理卵または低速加熱処理卵を戻し、3日間保管した。なお、その際、直径 9cm のガラスシャーレ内に水で湿らせた濾紙を置き、その上に敷いたガーゼに、チューブに浸漬された急速加熱処理卵または低速加熱処理卵を置き、飼育施設内にそのシャーレを置いた。その後、孵化した卵数を確認した。なお、それぞれの殺虫処理において 300 を超える卵を供試した。

2.2.3 ATP 量分析に供試した無処理卵または殺虫処理卵

2.2.3.1 無処理卵

最初に、直径 9cm のガラスシャーレ内に水で湿らせた濾紙を置き、その上に敷いたガーゼに採卵直後（採卵後 30 分以内）の卵を置きシャーレに蓋をした。次に、26℃に設定した飼育施設で、0 時間（0 時間齢）（すなわち、保管を行っていないことを示す）、2 時間（2 時間齢）、4 時間（4 時間齢）、18 時間（18 時間齢）、24 時間（24 時間齢）または 30 時間（30 時間齢）、卵を保管した。そして、以下に記載した方法で、これらの ATP 量を測定した。

2.2.3.2 凍結処理

最初に、直径 9cm のガラスシャーレ内に水で湿らせた濾紙を置き、その上に敷いたガーゼに採卵直後（採卵後 30 分以内）の卵を置きシャーレに蓋をした。次に、26℃に設定した飼育施設内で卵を、0 時間（0 時間齢）（すなわち、保管を行っていないことを示す）、4 時間（4 時間齢）または 24 時間（24 時間齢）、保

管した。 -30°C に設定したウルトラディープフリーザー (MDF192, SANYO, Japan) で、これらを 24 時間凍結処理した。その後、フリーザーから取り出した直後の卵 (処理後 0 時間) ATP 量を以下に記載した方法で測定した。さらに、フリーザーから取り出した後、 5°C に設定したバイオマルチインキュベーターで 4 時間 (処理後 4 時間) または 24 時間 (処理後 24 時間)、保管した後の卵 ATP 量を測定した。併せて、フリーザーから取り出した後、 26°C に設定した飼育施設で 4 時間 (処理後 4 時間) または 24 時間 (処理後 24 時間)、保管した後の卵 ATP 量も測定した。

2.2.3.3 低温処理

最初に、直径 9cm のガラスシャーレ内に水で湿らせた濾紙を置き、その上に敷いたガーゼに採卵直後 (採卵後 30 分以内) の卵を置きシャーレに蓋をした。次に、 26°C に設定した飼育施設内で卵を、0 時間 (0 時間齢) (すなわち、保管を行っていないことを示す)、4 時間 (4 時間齢) または 24 時間 (24 時間齢)、保管した。その後、 1°C に設定した低温インキュベーター (FMU-053I, Fukushima Industries, Japan) で、これらを 2 週間保管した。そして、インキュベーターから取り出した直後の卵 (処理後 0 時間) ATP 量を以下に記載した方法で測定した。さらに、インキュベーターから取り出した後、 5°C に設定したバイオマルチインキュベーターで 4 時間 (処理後 4 時間) または 24 時間 (処理後 24 時間)、保管した後の卵 ATP 量を測定した。

2.2.3.4 急速加熱処理

検疫における温湯浸漬処理は一定温度の温水に果実を浸漬する処理であるが、実際に輸出国で使用されている温湯浸漬処理装置を用いて試験を行うことは現実的に困難である。このため、ミカンコミバエ卵の殺虫処理方法として、温湯浸漬処理をシミュレートした急速に規定温度までの加熱を行う急速加熱処理を採用した。

照屋ら（2012）は、果実の果皮直下温度は温湯浸漬処理で急速に上昇することを報告した。また、ミバエ卵は果皮直下に産卵される（Christenson and Foote, 1960）。そのため、急速加熱処理は温湯浸漬処理と同様の状況をシミュレートし、後述のとおり実際の温湯浸漬処理における試験より簡便である。実際の温湯浸漬処理の一例として、ブラジルから日本向けに輸出されるマンゴウは 47℃の温湯に浸漬された後、果実の中心温度が 46℃に到達すると、この温度が 5 分間保持されることが農林水産省告示で規定されている（農林水産省植物防疫所, 2019b）。温湯浸漬処理で果実の中心温度が規定された温度に到達するために必要な時間は果実のサイズおよび形状によって異なる。このため、日本の告示に温湯浸漬処理の合計処理時間は明記されず、その代わり、上記の温湯温度、果実中心温度およびその保持時間が明記される（農林水産省植物防疫所, 2019b）。一方、アメリカの処理マニュアル（USDA, 2016）には、チチュウカイミバエのようなミバエの分布する国からアメリカ向けに輸出されるマンゴウの合計温湯処理時間が明記されている。その処理時間は果実の重量に応じて 65-110 分の範囲にあることとされている。

上記を勘案し、次のとおり急速加熱処理を実施した。最初に、直径9cmのガ

ラスシャーレ内に水で湿らせた濾紙を置き、その上に敷いたガーゼに採卵直後（採卵後30分以内）の卵を置きシャーレに蓋をした。次に、26℃に設定した飼育施設内で、0時間（0時間齢）（すなわち、保管を行っていないことを示す）、4時間（4時間齢）または24時間（24時間齢）、採卵直後の卵を保管した。次に、ポリプロピレンチューブに50μLの蒸留水を入れ、卵を浸漬した。その後、48℃に設定したサーマルサイクラー (PROGRAMTEMP CONTROL SYSTEM PC-818, Astec, Japan) に卵を入れたチューブをセットし180分間維持した。本研究において、卵の処理温度および処理時間は、それぞれ、実際の殺虫処理で想定し得る最高温度および最長時間を採用した。処理温度である48℃および処理時間である180分は、それぞれ、後述の低速加熱処理における最高処理温度および加熱開始から処理終了までにかかる時間と同じである。その後、サーマルサイクラーから取り出した直後の卵ATP量を以下に記載した方法で測定した。さらに、シャーレ内に水で湿らせた濾紙を置き、その上に敷いたガーゼにサーマルサイクラーから取り出した直後の卵を置きシャーレに蓋をした。そして、5℃に設定したバイオマルチインキュベーターにこれらのシャーレを置き、4時間または24時間、保管した後の卵ATP量を測定した。

2.2.3.5 低速加熱処理

検疫における蒸熱処理は、一定温度の飽和蒸気で果実を加熱する処理であるが、実際に輸出国で使用されている蒸熱処理装置を用いて試験を行うことは現実的に困難である。このため、ミカンコミバエ卵の殺虫処理方法として蒸熱処理をシミュレートした低速で規定温度までの加熱を行う低速加熱処理を採用し

た。

ミバエの産卵場所である果皮直下温度は，蒸熱処理の間，低速で増加する。
Omura et al. (2014) は，飽和蒸気によって加熱されたナンドクマイ種マンゴウにおける最も外側の果肉平均温度が 27.8℃から 47.2℃まで上昇するのに 67 分を要したこと，つまり，およそ 0.29℃／分の割合で温度上昇したことを報告した。また，同様に飽和蒸気で加熱されたケント種マンゴウにおける最も外側の果肉平均温度が 28.0℃から 47.1℃まで上昇するのに 74 分を要したこと，つまり，およそ 0.26℃／分の割合で温度上昇したことも報告した。そのため，低速加熱処理は蒸熱処理と同様の状況をシミュレートし，後述のとおり実際の蒸熱処理における試験より簡便である。

実際の蒸熱処理の一例として，インドから日本向けに輸出されるマンゴウは 50℃の飽和蒸気内に置かれた後，果実の中心温度が47.5℃に到達すると，この温度が20分間保持されることが農林水産省告示で規定されている（農林水産省植物防疫所, 2019b）。蒸熱処理で果実の中心温度が規定された温度に到達するために必要な時間は果実のサイズおよび形状によって異なる（Omura et al., 2014）。そのため，日本の告示に蒸熱処理開始から終了までの合計処理時間は明記されず，その代わり，上記の飽和蒸気温度，果実中心温度およびその保持時間が明記される（農林水産省植物防疫所, 2019b）。一方，アメリカの処理マニュアル（USDA, 2016）には，フィリピンからアメリカ向けに輸出されるマンゴウの処理開始から果肉温度を規定温度に上昇させるのに要する時間（240分間）が明記されている。さらに，果肉温度が規定温度以上に上昇した後，10分間，この温度が維持されなければならない旨も規定されている。

上記を勘案し、次のとおり低速加熱処理を実施した。最初に、直径9cmのガラスシャーレ内に水で湿らせた濾紙を置き、その上に敷いたガーゼに採卵直後（採卵後30分以内）の卵を置きシャーレに蓋をした。次に、26℃に設定した飼育施設内で採卵直後の卵を、0時間（0時間齢）（すなわち、保管を行っていないことを示す）、4時間（4時間齢）または24時間（24時間齢）、保管した。次に、ポリプロピレンチューブに50μLの蒸留水を入れ、卵を浸漬した。その後、以下のとおりプログラムしたサーマルサイクラーにチューブをセットした。①まず、26℃で1分間維持した。②次に、約0.15℃／分の割合で直線的に26℃から48℃まで150分間、温度を増加させた。③最後に48℃で30分間維持した。その後、サーマルサイクラーから取り出した直後の卵ATP量を以下に記載した方法で測定した。さらに、シャーレ内に水で湿らせた濾紙を置き、その上に敷いたガーゼにサーマルサイクラーから取り出した直後の卵を置きシャーレに蓋をした。そして、5℃に設定したバイオマルチインキュベーターにこれらのシャーレを置き、4時間または24時間、保管した後の卵ATP量を測定した。

検疫における実際の蒸熱処理でATP分解酵素が失活しATPが分解しない可能性を考慮して、低速加熱処理の処理温度および処理時間はそれぞれ、実際の殺虫処理で想定し得る最高温度および比較的長い時間を採用した。なお、蒸熱処理の処理時間は、輸出国の処理施設によっては180分を超える可能性がある。

2.2.4 ATP 量分析

2.2.4.1 ATP 量分析に使用した測定装置および ATP 測定用試薬キット

ATP量の測定装置としてルミノメーター（Lumitester C-110, Kikkoman, Japan）

を使用した。また、ATP測定用試薬キットとしてルシフェール250プラス（CheckLite, Kikkoman, Japan）およびルシフェールATP標準試薬セット（ATP standard solution, Kikkoman, Japan）を使用した。ルシフェール250プラスは、発光試薬としてのルシフェリン、ルシフェラーゼおよび酢酸マグネシウムの混合物、発光試薬溶解液としてのトリシン緩衝液ならびにATP抽出試薬としての界面活性剤で構成される。ルシフェールATP標準試薬セットは、ATP標準試薬としてのATP、硫酸マグネシウムおよび牛血清アルブミンの混合物ならびに標準試薬溶解希釈液としてのHEPES緩衝液で構成される。

本研究で使用したルミノメーターおよびルシフェール250プラスを用いた節足動物のATP量分析はこれまで報告されていない。ところで、海老名ら（2004）およびEbina and Ohto（2007）で報告されたATP量分析の方法は、本研究とほぼ同様である。一方、これらの報告で使用されたATP量測定装置およびATP測定試薬キットは、現在、製造・販売されておらず本研究で使ったものと異なっているが、これらの報告で使用されたATP測定試薬キットの構成成分は、本研究で使ったものとほぼ同様である。

2.2.4.2 ATP量分析の手順

まず、1.5mLマイクロチューブに5%トリクロロ酢酸1mLを入れ、ピンセットを使用してATP量分析の対象となる1卵のミカンコミバエ卵を入れた後、30秒以内にペレットミキサーで卵を破碎した。破碎後、ミキサーをチューブから抜かない状態で10分間静置した後にミキサーを上下に動かし5回程度攪拌した（チューブ①）。別のマイクロチューブに0.001Mのエチレンジアミン四酢酸を含む

0.04MのTRIS-acetate (pH 8.3に調整) (1 × TAEバッファー) 900μLを入れ、このチューブにチューブ①から100μLを移し10回程度ピペッティングして攪拌した (チューブ②)。次に、ディスポーザブルチューブ (Lumitube 3.5ml type, Kikkoman, Japan) にATP抽出試薬100μLを入れチューブ②から100μLを移した。このディスポーザブルチューブに発光試薬100μLを入れ、指先でチューブを軽くはじいて攪拌した。その後、ルミノメーターに、このディスポーザブルチューブをセットし発光量の測定を開始した。なお、ディスポーザブルチューブに発光試薬を入れてから3秒以内に測定を開始した。測定開始から約10秒後、1卵ごとの発光量が記録された。

ATP量分析の実施日ごとにメーカーのマニュアルに従ってATP標準試薬を基準とした検量線を作成した。そして、それぞれの卵における発光量および作成した検量線に基づいて1卵ごとのATP量 (pmol/egg) を計算した。

全てのATP量分析は26℃に設定した実験室内で実施された。ATP量分析に使用したマイクロチューブ、マイクロピペットのピペットチップ、ピンセット、ペレットミキサーおよびディスポーザブルチューブは全て滅菌済みであった。

2.2.5 孵化率および ATP 量の解析

統計ソフトR (R Core Team, 2019) を使用したFisher's exact testで、無処理卵ならびに24時間5℃で保管した0時間齢卵、4時間齢卵および24時間齢卵の孵化率を解析した。また、統計ソフトJMP バージョン11 (SAS Institute, 2013) を使用したTukey-Kramer testで、無処理卵、凍結処理卵、低温処理卵、急速加熱処理卵および低速加熱処理卵のATP量を解析した。

2.3 結果

2.3.1 孵化率

2.3.1.1 無処理卵ならびに24時間5℃で保管した0時間齢卵，4時間齢卵および24時間齢卵の孵化率

無処理卵では300卵中272卵が孵化し，その孵化率は90.7%であった。また，24時間5℃で保管した0時間齢卵，4時間齢卵および24時間齢卵では，それぞれ，300卵中4卵，55卵および273卵が孵化し，これらの孵化率は，それぞれ，1.3%，18.3%および91.0%であった。次に，無処理卵と5℃で保管した24時間齢卵における孵化率の間に有意な差はなかった（Fisher's exact test, $p > 0.05$ ）。5℃で保管した0時間齢卵と4時間齢卵における孵化率の間に有意な差はなかった（Fisher's exact test, $p > 0.05$ ）。しかし，無処理卵および5℃で保管した24時間齢卵の孵化率は，5℃で保管した0時間齢卵および4時間齢卵と有意な差があった（Fisher's exact test, $p < 0.05$ ）。

2.3.1.2 凍結処理，低温処理，急速加熱処理または低速加熱処理を行った卵の孵化率

全ての処理で卵は孵化しなかった。すなわち，全ての処理卵における孵化率は0%であった。

2.3.2 無処理卵または殺虫処理卵のATP量

2.3.2.1 無処理卵のATP量

Table 2.1 および Fig. 2.1 に無処理卵の供試卵数および ATP 量を示した。卵齢が

0 時間齢から 2 時間齢まで進行したとき平均 ATP 量は減少したが、これらに有意な差はなかった (Tukey-Kramer test, $p > 0.05$)。卵齢が 2 時間齢から 4 時間齢まで進行したとき平均 ATP 量は有意に減少した (Tukey-Kramer test, $p < 0.05$)。卵齢が 4 時間齢から 18 時間齢まで進行したとき平均 ATP 量はわずかに増加したが、これらに有意な差はなかった (Tukey-Kramer test, $p > 0.05$)。卵齢が 18 時間齢から 30 時間齢まで進行したとき平均 ATP 量は減少したが、これらに有意な差はなかった (Tukey-Kramer test, $p > 0.05$)。30 時間齢卵の平均 ATP 量は 0 時間齢卵の 48%であった。

2.3.2.2 凍結処理卵のATP量

Table 2.1およびFig. 2.2に凍結処理卵の供試卵数およびATP量を示した。凍結処理後5℃または26℃で保管した卵平均ATP量は時間の経過とともに減少した。凍結処理後0時間経過後、すなわち、フリーザーから取り出した直後の卵平均ATP量は、0時間齢、4時間齢および24時間齢において、同じ卵齢における無処理卵平均ATP量のそれぞれ、79.7%, 85.8%および42.7%であった。凍結処理後5℃で4時間経過後の卵平均ATP量は、それぞれ、37.8%, 26.8%および3.5%であった。凍結処理後26℃で4時間経過後の卵平均ATP量は、それぞれ、0.8%, 0.6%および0.0%であった。凍結処理後5℃で24時間経過後の卵平均ATP量は、それぞれ、1.0%, 0.9%および1.5%であった。凍結処理後26℃で24時間経過後の卵平均ATP量は、それぞれ、1.6%, 0.0%および0.0%であった。また、全ての卵齢において、凍結処理後5℃で4時間経過後の卵平均ATP量は、凍結処理後26℃で4時間経過後の卵より多かった。なお、0時間齢卵において、凍結処理後5℃で4時間

経過後の卵平均ATP量は、26℃で4時間経過後の卵より有意に多かった (Tukey-Kramer test, $p < 0.05$)。一方、4時間齢卵および24時間齢卵において、凍結処理後5℃で4時間経過後の卵平均ATP量と26℃で4時間経過後の卵平均ATP量の間には有意な差はなかった (Tukey-Kramer test, $p > 0.05$)。そして、全ての卵齢において、凍結処理後5℃または26℃で24時間経過後の卵平均ATP量に有意な差はなかった (Tukey-Kramer test, $p > 0.05$)。無処理卵の最低ATP量は、30時間齢卵の268pmol/eggで、凍結処理後24時間経過後の卵最高ATP量は、凍結処理後5℃で保管した0時間齢卵の57.8pmol/eggであった。すなわち、凍結処理後24時間経過後の卵最高ATP量は無処理卵最低ATP量の21.6%であり、明らかに少ない値であった (Figs. 2.1, 2.2)。

2.3.2.3 低温処理卵のATP量

Table 2.1およびFig. 2.3に低温処理卵の供試卵数およびATP量を示した。低温処理後5℃で24時間経過後の0時間齢卵平均ATP量は無処理の0時間齢卵の76.3%であり、これらの差は有意であった (Tukey-Kramer test, $p < 0.05$)。低温処理後24時間経過後の4時間齢卵平均ATP量は無処理の4時間齢卵の154.9%であり、これらの差は有意であった (Tukey-Kramer test, $p < 0.05$)。低温処理後24時間経過後の24時間齢卵平均ATP量は無処理の24時間齢卵の117.6%であったが、これらの差は有意ではなかった (Tukey-Kramer test, $p > 0.05$)。無処理卵の最低ATP量は30時間齢の268pmol/eggであった。低温処理後24時間経過後で、0時間齢卵における1卵のATP量 (30pmol/egg) を除く、全ての低温処理卵ATP量は、無処理卵の最低ATP量を上回った (Fig. 2.1, 2.3)。

2.3.2.4 急速加熱処理卵および低速加熱処理卵のATP量

Table 2.1およびFig. 2.4に、急速加熱処理卵または低速加熱処理卵の供試卵数およびATP量を示した。急速加熱処理または低速加熱処理後、全ての卵齢の平均ATP量は有意に減少した (Tukey-Kramer test, $p < 0.05$)。急速加熱処理卵の平均ATP量は低速加熱処理卵より大きく減少した。急速加熱処理後5℃で24時間経過後の0時間齢、4時間齢および24時間齢卵の平均ATP量は同じ卵齢における無処理卵のそれぞれ、0.1%, 0.0%および0.0%であった。低速加熱処理後24時間経過後の0時間齢、4時間齢および24時間齢卵の平均ATP量は同じ卵齢における無処理卵のそれぞれ、20.5%, 34.6%および6.3%であった。急速加熱処理後24時間経過後の0時間齢、4時間齢および24時間齢卵ならびに低速加熱処理後24時間経過後の24時間齢卵における平均ATP量に有意な差はなかった (Tukey-Kramer test, $p > 0.05$)。低速加熱処理後24時間経過後の0時間齢および4時間齢卵における平均ATP量に有意な差はなかった (Tukey-Kramer test, $p > 0.05$)。急速加熱処理後24時間経過後の0時間齢、4時間齢および24時間齢卵ならびに低速加熱処理後24時間経過後の24時間齢卵における平均ATP量は、低速加熱処理後24時間経過後の0時間齢および4時間齢卵と有意な差があった (Tukey-Kramer test, $p < 0.05$)。無処理卵の最低ATP量は30時間齢の268pmol/eggで、急速加熱処理後24時間経過後の卵最高ATP量は0時間齢卵の7.5pmol/egg (無処理卵最低ATP量の2.8%) であり、処理後24時間経過後の急速加熱処理卵最高ATP量は無処理卵最低ATP量より少なくなった (Fig. 2.1, 2.4)。低速加熱処理後24時間経過後で、2卵のATP量、0時間齢卵の283.9pmol/eggおよび4時間齢卵の303.7pmol/eggが、無処理卵最低ATP量を上回った (Fig. 2.1, 2.4)。

2.4 考察

無処理卵の孵化率は90.7%であった。24時間5℃で保管した0時間齢卵の孵化率は1.3%で4時間齢卵は18.3%であった一方、24時間齢卵は91%であった。そして、5℃で保管した0時間齢および4時間齢無処理卵の孵化率は、5℃で保管した24時間齢無処理卵と有意な差があった。Dohino et al. (2014) は、卵齢の進行に伴いミカンコミバエ卵の低温耐性が上昇することを報告した。そのため、本研究の結果はDohino et al. (2014) の報告と近似している。また、孵化率の調査に供試した全ての殺虫処理卵は孵化しなかった。このため、本結果は、これらの殺虫処理が実際の検疫処理と同様、有効な完全殺虫処理であったことを示す。

次に、26℃で保管したミカンコミバエ無処理卵の平均ATP量は卵齢が0時間齢から30時間齢に進行するとき有意に減少した (Table 2.1, Fig. 2.1)。さらに、本研究では示していないが、26℃で保管したウリミバエ無処理卵の卵齢が0時間齢から18時間齢まで進行するとき、その平均ATP量が有意に減少したことも確認している (Tukey-Kramer test, $p < 0.05$) (上地・加土井, 未発表)。

海老名ら (2004) は、フラバゾウムシ卵のATP量が、産卵直後の卵で多くなり卵齢の進行に伴い減少したことを報告しており、本研究の結果はこの報告と近似しているが、その詳細な理由は明らかでない。海老名ら (2004) は、胚子発生の初期段階で体組織や代謝機能の発育が途上であるため、栄養素があったとしても卵内の養分を消費してATP を合成する能力が低いいため若齢卵は多量のATPを要すると推測した。一方で、Phillips et al. (2015) は、10℃または20℃で保管したイエバエ卵のATP量が卵齢の進行に伴い増加したことを報告しており、同じハエ目に属するミカンコミバエを供試した本研究の結果は当報告と異なっ

いた。従って、卵齢の進行に伴うATP量の増減傾向は種や分類群によって異なっているかもしれない。

凍結処理後5℃または26℃で保管した卵平均ATP量は、保管時間の経過に伴って減少し、無処理卵より有意に少なかった (Table 2.1, Fig. 2.2)。また、全ての卵齢において、凍結処理後5℃で4時間経過後の卵平均ATP量は、26℃で4時間経過後の卵より多かった。そして、全ての卵齢において、凍結処理後5℃または26℃で24時間経過後の卵における全ての平均ATP量に有意な差はなく、無処理卵最低ATP量は、凍結処理後24時間経過後の卵最高ATP量より多かった (Fig. 2.1, 2.2)。海老名ら (2004) は、凍結処理後、室温で2時間経過後のフラーバラゾウムシ卵における平均ATP量が無処理卵の0.76%であったことを報告した。本研究は、凍結処理後26℃で4時間経過後の卵平均ATP量は同じ卵齢における無処理卵の0.0-0.8%であったので、海老名ら (2004) の報告と近似している。一方、本研究では、凍結処理後5℃で4時間経過後の卵平均ATP量は同じ卵齢における無処理卵の3.5-37.8%であり、凍結処理後26℃で4時間経過後の卵より多かった。本結果は、処理後の保管温度がATP量の減少割合に影響することを示している。さて、凍結処理後5℃で4時間経過後の卵平均ATP量が26℃で4時間経過後の卵ほど急速に減少しなかった原因は、凍結処理後の5℃という低温保管条件で生じたATP分解酵素活性の低下による、ATP分解の阻害にあったと推定される。

低温処理後24時間経過後の卵平均ATP量は、0時間齢、4時間齢および24時間齢でそれぞれ、無処理卵の76.3%、154.9%および117.6%であり、低温処理後24時間経過後の4時間齢卵平均ATP量は無処理卵より有意に多かった (Table 2.1,

Fig. 2.3)。また、低温処理後24時間経過後の全ての卵齢における低温処理卵のATP量は、1卵を除き、全て無処理卵の最低ATP量を上回った (Fig. 2.1, 2.3)。本結果の詳細な理由は明らかでないが、説明の一つとして、低温処理によって引き起こされた生理的なダメージに反応するため、または、そのダメージを修復するため、卵の代謝率が増加した可能性が挙げられる。Phillips et al. (2015) は、臭化メチルくん蒸処理後のイエバエ卵が、3-20日の期間を費やして死に至ったことを報告した。この報告を考慮すると、本研究において低温処理後24時間経過後の卵は孵化能力を失っているが完全には死んでいない瀕死の状態であった可能性もあろう。ところで、実際の検疫措置としての低温処理における処理温度は通常0.5-3.0℃である。また、海上または航空輸送の間に維持される温度は通常5℃程度であり実際の検疫措置としての低温処理における処理温度に近い。このため、輸送時の保管温度によって、検疫措置として低温処理された卵の瀕死状態が輸入港における検疫の時点まで継続する可能性が高い。従って、実際の検疫で、低温殺虫処理されたミバエ卵にATP量分析を適用することは困難であると推定される。

急速加熱処理または低速加熱処理後、全ての卵齢の処理卵における平均ATP量は有意に減少した。急速加熱処理卵の平均ATP量は低速加熱処理卵より大きく減少した。急速加熱処理後5℃で24時間経過後の卵平均ATP量は同じ卵齢の無処理卵の0.0-0.1%であった一方、低速加熱処理後5℃で24時間経過後の卵は6.3-34.6%であった。急速加熱処理後24時間経過後の0時間齢、4時間齢および24時間齢卵ならびに低速加熱処理後24時間経過後の24時間齢卵の平均ATP量に有意な差はなかった。低速加熱処理後24時間経過後の0時間齢および4時間齢卵の平

均ATP量に有意な差はなかった。急速加熱処理後24時間経過後の0時間齢、4時間齢および24時間齢卵ならびに低速加熱処理後24時間経過後の24時間齢卵の平均ATP量は、低速加熱処理後24時間経過後の0時間齢および4時間齢卵と有意な差があった（Table 2.1, Fig. 2.4）。Forney et al.（1991）は、55℃の温湯に浸漬して殺虫処理したフラーバラゾウムシ卵のATP量が、処理後24時間経過後、無処理卵の40%を超えていたことを報告し、55℃という高温によって生じた一部のATP分解酵素の失活によって本現象が生じた可能性を推測した。本研究では、48℃での急速加熱処理後5℃で24時間経過後の卵平均ATP量は同じ卵齢の無処理卵の0.0-0.1%であり、48℃で急速加熱処理したミカンコミバエ卵のATP量は急速に減少した。48℃という温度で、ミカンコミバエ急速加熱処理卵のATP分解酵素はほとんど失活されないのかもしれない。検疫の殺虫処理として規定された温湯浸漬処理はミバエ卵が産卵される果皮直下の温度を急速に上昇させるため、実際の検疫で温湯浸漬処理された卵は本研究の急速加熱処理卵と同様の状況にあると考えられる。これを踏まえると、実際の検疫におけるミバエ温湯浸漬処理卵のATP量は本研究の急速加熱処理卵と同様、急速に減少する可能性がある。検疫でミバエの温湯浸漬処理卵にATP量分析が適用できるかもしれないが、本研究で採用した急速加熱処理の処理時間は実際の検疫で実施される温湯浸漬処理の処理時間より長い可能性がある。将来、検疫におけるATP量分析の適用に向けた検証試験として、輸出国に分布するミバエに産卵された果実を温湯浸漬処理し、その処理後、果実内処理卵のATP量分析を実施することが望まれる。

低速加熱処理卵の平均ATP量は有意に減少したが急速加熱処理卵ほど大きく

減少しなかった。低速加熱処理後24時間経過後の卵平均ATP量は、同じ卵齢における無処理卵の6.3-34.6%であり、低速加熱処理後24時間経過後における2卵のATP量が無処理卵の最低ATP量を上回った。急速加熱処理および低速加熱処理卵は、完全に孵化能力を失っておりダメージを受けていると推測される。さて、急速加熱処理卵と低速加熱処理卵のATPが、同様の方法でATP分解酵素によって分解されると仮定すると、その受けたダメージで急速加熱処理卵はATP合成が強く阻害されているのに対し、低速加熱処理卵はATP合成が強く阻害されていないのかもしれない。Shamsudin et al. (2009) は、30-37℃の温湯に浸漬することで順化处理したクインスランドミバエ卵および順化处理していない本種卵を、46℃の温湯に浸漬し、それらの致死率を比較した。その結果、順化处理した一部の卵における致死率が、順化处理していない卵と比較して有意に低くなった。本結果に基づき、順化处理した一部の卵における致死率の低下は、順化处理で卵内に熱ショックタンパク質が合成されたことによって引き起こされたと推測した。本研究において、低速加熱処理における低速での加熱が、Shamsudin et al. (2009) で報告された順化处理と同様の状況を作り出し、熱ショックタンパク質が合成された可能性が考えられる。その後、本タンパク質によるATP合成に関係するタンパク質の修復、タンパク質変性の抑制等の機能が働き、卵内のATP合成阻害が弱まったのかもしれない。さて、本研究における蒸熱処理をシミュレートした低速加熱処理卵2卵のATP量が無処理卵の最低ATP量を上回った事実を考慮すると、蒸熱処理された輸入果実から発見されるミバエ卵にATP量分析を適用した場合、正常に処理された卵を無処理卵と判断してしまうおそれがある。その一方で、本研究における低速加熱処理卵の平均ATP

量は処理後の時間経過に伴い減少している。以上より、蒸熱処理後、ATP量分析が行われるまでに24時間を超える長い時間が経過する場合、ATP量はさらに減少すると推定され正常に処理された卵を無処理卵と判断してしまうリスクは低くなると考えられる。従って、実際の検疫におけるミバエの蒸熱処理卵にATP量分析が適用できる可能性も残されている。このため、将来、検疫におけるATP量分析の適用に向けた検証試験として、輸出国に分布するミバエに産卵された果実を蒸熱処理し、その処理後、24時間を超える長い時間が経過した果実内の処理卵におけるATP量分析を実施することが望まれる。なお、日本の検疫は、海上・航空輸送ともに通常、輸出国または輸送中における殺虫処理の2日から11日後に実施される。

これまで、ミバエ殺虫処理卵の迅速な生死判定法確立のためにATP量分析が行われ輸入検疫における本分析の適用可否について考察した報告はない。本研究は、ミカンコミバエ卵のATP量が卵齢、殺虫処理方法および処理後の経過時間のような様々な要因に影響される可能性を明らかにした。さらに、温湯浸漬処理卵および蒸熱処理卵に対して、処理後、十分な時間が経過した後にATP量分析を行うのであれば、検疫の工程でミバエ卵の迅速な生死判定法としての本分析が適用できる可能性を示した。その一方、低温処理卵に対しては本分析を適用できない可能性が高いことを示した。前述のとおり、今後、検疫におけるATP量分析の適用に向けた検証試験として、輸出国に分布するミバエに産卵された果実を温湯浸漬処理または蒸熱処理し、殺虫処理から輸入検疫までの時間を勘案して、処理後24時間を超える時間が経過した後に果実内処理卵のATP量分析を実施することが望まれる。本検証試験では様々な要因がATP量分析の結

果に影響するかもしれない。これらの要因として、ミバエの種、ミバエの産卵管長と関係した産卵部位の深さ、果実の硬度、殺虫処理時間、果実の中心部の低温等が挙げられる。今後、これらの要因を検討する必要がある。

Phillips et al. (2013) は、迅速かつ定性的な生死判定法として、節足動物生体内における ATP の存在をシグナルとして発色を生じさせる比色分析法を開発した。将来、実施されるべき上述の検証試験で、無処理卵と殺虫処理卵の ATP 量に明瞭な差が検出されるのであれば、検疫に役立てるため、この報告に基づく比色分析法を使用してミバエ殺虫処理卵の生死判定のための検証試験が行われることも望まれる。また、Phillips et al. (2014) は、検疫における生死判定に役立てるため、イエバエ科、コナジラミ科およびゾウムシ科昆虫を供試して虫体内の酵素活性を調査した。その結果、供試虫の死後、いくつかの酵素は急速に不活性化したことが明らかになり昆虫体内の酵素活性に基づく生死判定法開発の可能性を示した。この報告を考慮の上、重要ミバエの生死判定に役立つ分析法開発のため、ミバエを供試して生存虫と死亡虫の酵素活性を比較することも必要であるかもしれない。

Table 2.1 Treatments, egg age, assayed number (number of eggs), and mean ATP concentrations for ATP assays of *Bactrocera dorsalis*

Untreated eggs				Freezing				Cold treatment				Rapid heating				Slow heating			
Egg age (hours)	Assayed number	Mean ATP concentration \pm SE (pmol / egg)		Egg age (hours)	Hours after treatment	Assayed number	Mean ATP concentration \pm SE (pmol / egg)	Egg age (hours)	Hours after treatment	Assayed number	Mean ATP concentration \pm SE (pmol / egg)	Egg age (hours)	Hours after treatment	Assayed number	Mean ATP concentration \pm SE (pmol / egg)	Egg age (hours)	Hours after treatment	Assayed number	Mean ATP concentration \pm SE (pmol / egg)
0	35	769.4 \pm 20.5		0	0	15	613.1 \pm 31.7	0	0	15	715.5 \pm 67.0	0	0	15	4.1 \pm 0.8	0	0	15	250.1 \pm 15.9
2	16	682.2 \pm 20.7		4	4	15	291.2 \pm 48.3	4	4	10	657.7 \pm 74.0	4	4	10	3.2 \pm 2.5	4	4	15	221.8 \pm 22.0
						5 ^a	6.0 \pm 4.1 ^a												
				24	24	15	7.5 \pm 4.2	24	24	10	586.9 \pm 71.5	24	24	10	1.0 \pm 0.7	24	24	15	157.7 \pm 16.0
						5 ^a	12.1 \pm 5.8 ^a												
4	10	466.2 \pm 10.8		4	0	15	400.1 \pm 24.6	4	0	15	615.8 \pm 16.1	4	0	15	2.4 \pm 0.5	4	0	15	244.0 \pm 15.2
				4	4	15	125.0 \pm 22.0	4	4	15	717.4 \pm 29.4	4	4	10	5.1 \pm 2.9	4	4	15	213.0 \pm 11.9
						5 ^a	3.0 \pm 0.7 ^a												
18	20	486.9 \pm 33.0		24	24	10	4.0 \pm 2.9	24	24	15	722.3 \pm 31.4	24	24	10	0.0 \pm 0.0	24	24	15	161.4 \pm 16.1
						5 ^a	0.0 \pm 0.0 ^a												
24	15	410.4 \pm 13.3		24	0	15	175.2 \pm 50.0	24	0	15	410.8 \pm 39.3	24	0	14	0.5 \pm 0.5	24	0	15	117.2 \pm 14.3
				4	4	15	14.2 \pm 8.3	4	4	15	340.0 \pm 31.3	4	4	10	0.5 \pm 0.5	4	4	15	41.3 \pm 9.3
						5 ^a	0.0 \pm 0.0 ^a												
30	10	369.4 \pm 25.0		24	24	15	6.0 \pm 3.7	24	24	10	482.5 \pm 20.4	24	24	10	0.0 \pm 0.0	24	24	15	25.7 \pm 10.5
						5 ^a	0.3 \pm 0.2 ^a												

^a Eggs were maintained at 26 °C after treatment

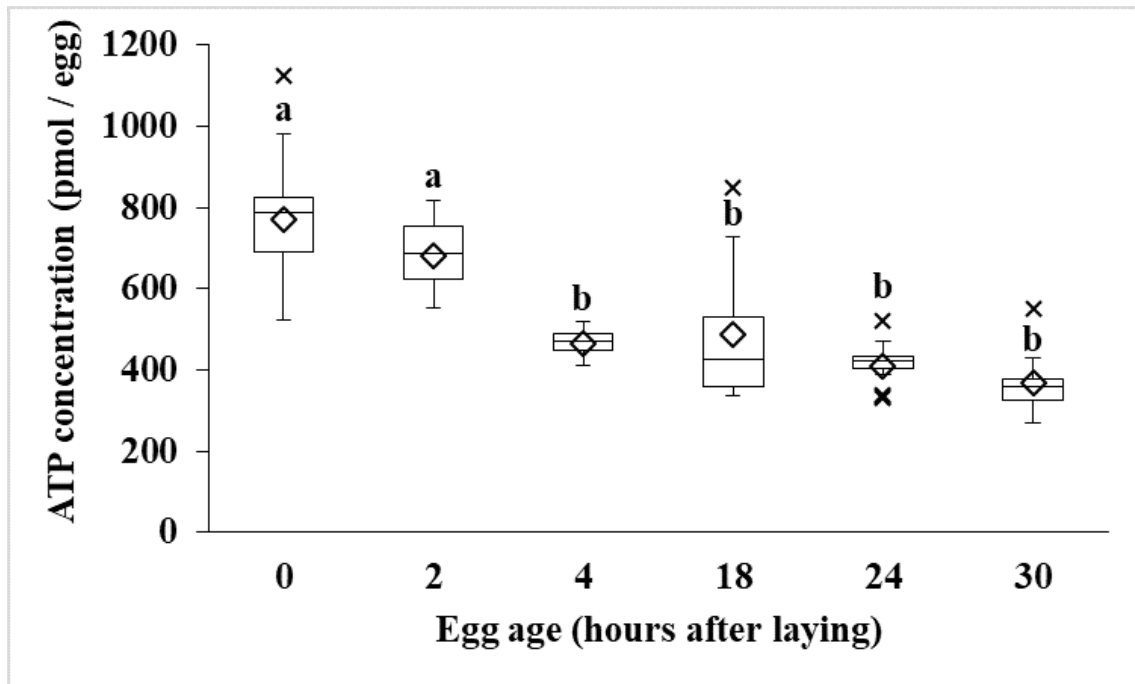


Fig. 2.1 Box plots of adenosine triphosphate (ATP) concentrations in untreated eggs of *Bactrocera dorsalis* at age 0-, 2-, 4-, 18-, 24-, and 30-h at 26 °C. The line inside the box represents the median value. The lower and upper edges of the box represent the first and third quartiles, respectively. Whiskers extend to the highest and lowest values that are within 1.5 times the distance between the first and third quartiles. Diamonds show means, and crosses show outliers. Different letters indicate significant differences (Tukey-Kramer test, $p < 0.05$)

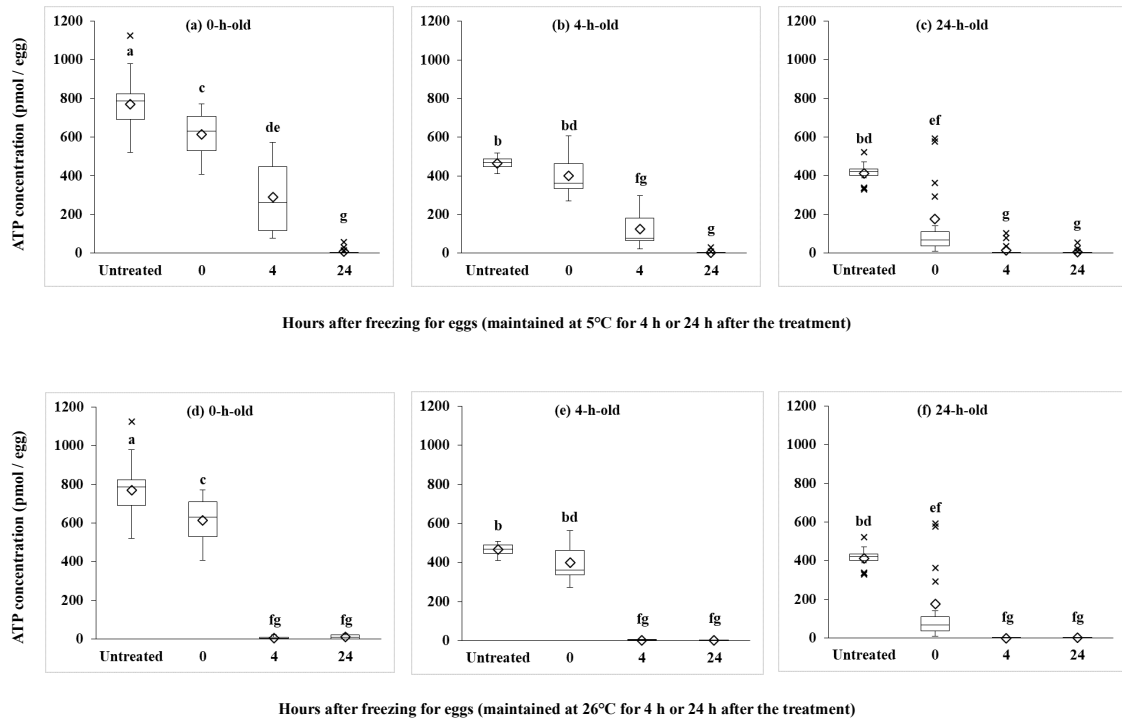


Fig. 2.2 Box plots of ATP concentrations in eggs of *B. dorsalis* treated with freezing at age 0, 4, and 24 h at 26 °C. ATP assays were conducted immediately after removing eggs from the freezer (0 h), or after maintaining them at 5 °C (a–c) for 4 or 24 h, or at 26 °C (d–f) for 4 or 24 h following freezing. For comparison, the ATP concentrations in the untreated 0-, 4-, and 24-h-old eggs (presented in Fig. 2.1) are shown. ATP concentrations (0 h) of eggs in assays conducted immediately after removing them from the freezer in a–c are the same as those in d–f, respectively. The line inside the box represents the median value. The lower and upper edges of the box represent the first and third quartiles, respectively. Whiskers extend to the highest and lowest values that are within 1.5 times the distance between the first and third quartiles. Diamonds show means, and crosses show outliers. Different letters indicate significant differences (Tukey-Kramer test, $p < 0.05$)

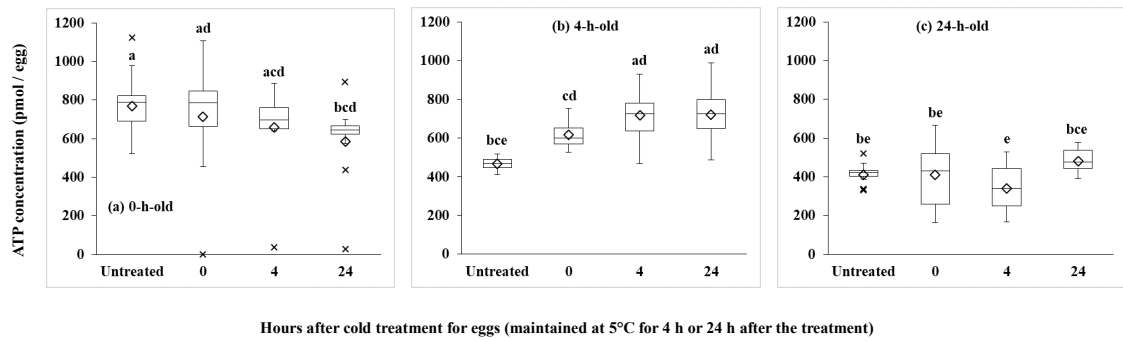


Fig. 2.3 Box plots of ATP concentrations in eggs of *B. dorsalis*, which underwent the cold treatment, at age 0-, 4-, and 24-h at 26 °C. Eggs were maintained at 5 °C for 4 or 24 h after treatment. For comparison, the ATP concentrations in untreated 0-, 4-, and 24-h-old eggs (presented in Fig. 2.1), are shown. The line inside the box represents the median value. The lower and upper edges of the box represent the first and third quartiles, respectively. Whiskers extend to the highest and lowest values that are within 1.5 times the distance between the first and third quartiles. Diamonds show means, and crosses show outliers. Different letters indicate significant differences (Tukey-Kramer test, $p < 0.05$)

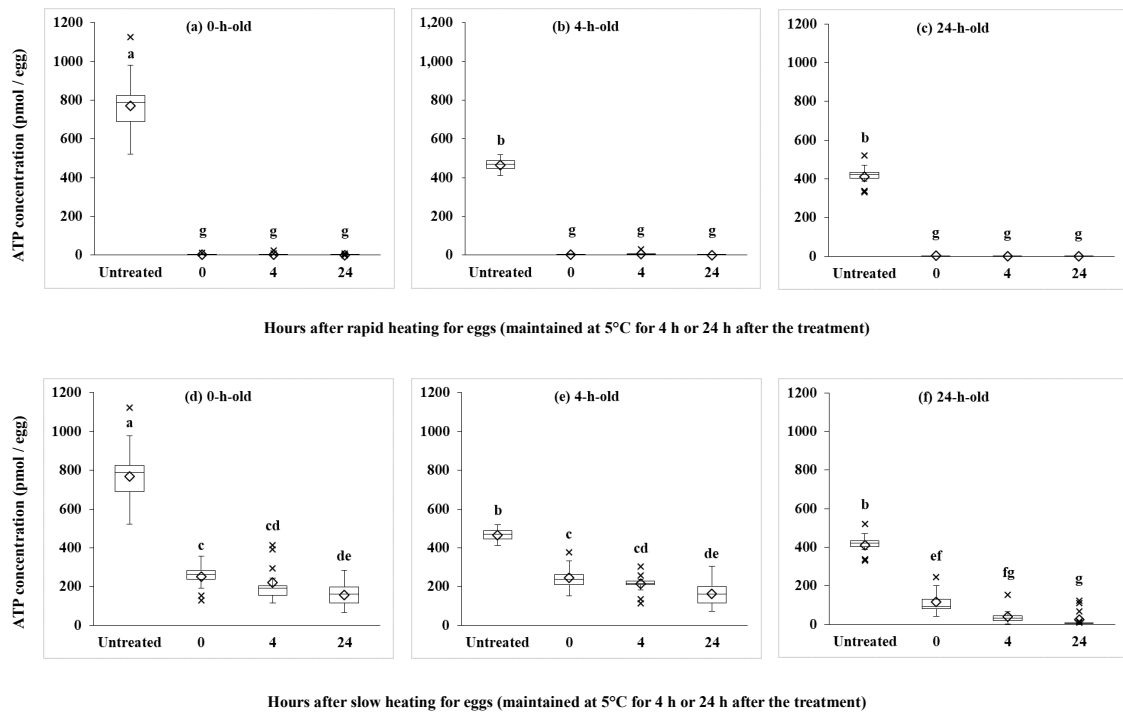


Fig. 2.4 Box plots of ATP concentrations in eggs of *B. dorsalis* treated with rapid heating (a–c) and slow heating (d–f) at ages 0-, 4-, and 24-h at 26 °C. Eggs were maintained at 5 °C for 4 or 24 h after treatment. For comparison, the ATP concentrations in untreated 0-, 4-, and 24-h-old eggs (presented in Fig. 2.1) are shown. The line inside the box represents the median value. The lower and upper edges of the box represent the first and third quartiles, respectively. Whiskers extend to the highest and lowest values that are within 1.5 times the distance between the first and third quartiles. Diamonds show means, and crosses show outliers. Different letters indicate significant differences (Tukey-Kramer test, $p < 0.05$)

第3章 ベトナム産セグロモモミバエの発育零点・有効積算温度および

侵入定着リスクが高い地域の推定

3.1 緒言

セグロモモミバエは我が国が侵入を警戒しているミバエの一種であり、成虫の体長が 5.4-6.0mm 程度で（農林水産省植物防疫所, 2011）、カンキツ類 *Citrus* spp., グアバ *Psidium guajava* L., マンゴウ, モモ *Amygdalus persica* L., サボジラ *Manilkara zapota* (L.) P. Royen 等の経済的に重要な種を含む幅広い範囲の生果実を食害する多食性の害虫である（Allwood et al., 1999; Tsuruta et al., 1997; White and Elson-Harris, 1992）。本種は我が国未発生であるが、インド、スリランカ、タイ、中国、ネパール、パキスタン、ベトナム、ミャンマー等のアジア諸国に広く分布し（Drew and Raghu, 2002; Drew and Romig, 2013; Wang, 1996; White and Elson-Harris, 1992）、我が国を含む未発生地域への侵入および分布拡大能力は高いと推定される。実際、Liu et al. (2013) は、近年、中国国内で本種が分布拡大していることを報告した。また、未発生地域の我が国（農林水産省植物防疫所, 2011）およびアメリカ（Weems, 1987）で実施されたモニタリングトラップ調査でも本種が捕獲されている。Vargas et al. (2015) は、被害の重大性、寄主範囲、侵入能力および食害頻度に基づきミバエ科 *Bactrocera* 属の害虫 73 種を区分けした。その結果、最も経済的重要性の高い区分に本種を入れた。本区分は植物検疫上の最重要害虫であるミカンコミバエ、ウリミバエ、クインスランドミバエ等も含む。我が国にセグロモモミバエが侵入定着した場合、果実生産に被害が生じるだけでなく国内外への果実流通規制等の植物検疫措置が実施されるかもしれない。

第1章でも示したとおり、2015年、最重要害虫のミカンコミバエが、一時的に、奄美大島に侵入した際、根絶のための緊急防除が実施され寄主果実であるカンキツ類の移動が規制された。そして、本土に奄美大島特産のポンカン、タンカン等を出荷できない事態が生じた（農林水産省植物防疫所, 2016a）。2015年および2017年、ミカンコミバエが一時的に我が国に侵入したことを受け韓国政府が我が国からの寄主植物の輸入を停止する事態も生じた（農林水産省植物防疫所, 2016b ; 2019a）（現在は無発生が確認され輸入停止は解除された）。ミカンコミバエと同様、セグロモモミバエもカンキツ類を食害する。また、我が国と同様、本種未発生の諸外国も本種の侵入を警戒している。このため、本種が我が国に侵入した場合、ミカンコミバエ侵入時と同様の事態が生じる可能性を排除できない。

我が国の輸入検疫で本種幼虫が頻繁に発見されている。例えば、2013年から2017年までの間、旅客の携帯品検査で果実から本種が265件発見されており、本件数はミカンコミバエ種群とナスミバエ *Bactrocera latifrons* (Hendel) の発見件数に次いで3番目に多い（農林水産省植物防疫所, 2019c）。また、セグロモモミバエが発見された植物はベトナム、タイ、ミャンマー等の10か国から輸入されたものである。発見件数が最も多い国はベトナムでありベトナム産本種の発見件数は件数全体の約74.7%であった。なお、Drew and Raghu (2002) は、本種がベトナム南部で商業生産されている果実に重大な被害を引き起こしていることを報告している。従って、ベトナム産本種の我が国への侵入可能性は非常に高いことに加え、ベトナム産本種が我が国に侵入した場合、重大な被害が生じるおそれもある。発見件数が2番目に多い国はタイでありタイ産本種の発見件数は件数全体の約17%である。そして、ベトナムとタイで本種の発見件数全体の

91.7%を占めている。

本種侵入時の経済的被害を最小限にするためには、早期に侵入が検出できる侵入警戒調査を実施する必要がある。また、万が一、本種が侵入定着した場合、迅速に有効な根絶防除を実行しなければならない。これらの理由から本種に対する効果的・効率的な侵入警戒調査および根絶防除技術の確立が望まれる。植物検疫措置に関する国際基準（FAO, 2016）の中で、経済的に重要なミバエの無発生地域に当該ミバエが侵入定着した場合、ミバエ無発生地域のステータスは停止することが規定されている。しかし、根絶防除等の植物検疫措置が実施され、その措置の完了後、通常、当該ミバエの3世代期間、モニタリング調査等による当該ミバエの発見がない場合、無発生地域のステータスが回復することも規定されており、我が国も本基準を採用している。2015年、ミカンコミバエが奄美大島に侵入した際、根絶防除の実施後、本基準に基づき3世代期間、奄美大島で本種の誘殺が確認されなかったこと等を踏まえて我が国から本種が根絶されたと判断された（農林水産省植物防疫所, 2016a）。従って、セグロモモミバエの効果的な定着防止技術の確立、つまり、根絶防除計画策定のために本種の世代期間を明らかにする必要がある。当然のことながら、本世代期間は科学的根拠に基づいたものでなければならない。このためには、本種を供試した実際の試験で世代期間を推定するための基本パラメータである発育零点 (T_0) および有効積算温度 (K) を推定しておかなければならない。また、効率的な侵入定着防止技術の確立に役立てるため、推定した T_0 および K に基づき日本各地における本種の発育・生殖可能月および年間発生世代数を推定することによって、本種の侵入・定着リスクが高い地域を推定しておくこともまた重要である。本種のリスク評価

に寄与するため、生存率や発育期間のようなデータを明らかにしておくことも必要であろう。

Liu and Ye (2009) は、中国・雲南省に分布する本種を供試した試験に基づき、本種の T_0 , K 等を推定した。しかし、上記のとおり我が国への侵入能力が高いと推定されるベトナム産本種の T_0 , K 等を明らかにするための研究は、これまで報告されていない。これまで報告された異なった国に分布するミバエ個体群における T_0 および K の間に大きな差がある。例えば、かつて奄美大島に発生していたミカンコミバエを累代飼育した個体群の T_0 および K と、ハワイに発生しているミカンコミバエを累代飼育した個体群の T_0 および K を比較すると、 T_0 で 6.25°C , K で 75.74 日度の差がある (佐伯ら, 1980; Vargas et al., 1996)。そのため、我が国が侵入を警戒しているセグロモモミバエの T_0 , K 等のより正確な推定のため、中国個体群以外の個体群、特に我が国への侵入能力が高いと推定される本種ベトナム個体群を供試して試験を行うことは有益である。

そこで、ベトナム産本種の卵、幼虫および蛹の生存率・発育期間ならびに成虫の産卵前期間を調査し、調査した発育期間および産卵前期間に基づき、卵期間、幼虫期間、蛹期間、卵から成虫羽化までの期間、産卵前期間および卵から羽化した成虫の産卵までの期間（一世代期間）における T_0 および K を推定した。そして、推定した T_0 および K に基づき、日本各地におけるベトナム産本種の発育・生殖可能月および年間発生世代数を推定した。

3.2 材料および方法

3.2.1 供試虫

2010 年に農林水産大臣の許可を得て（許可番号 21Y-1299），ベトナムの Post-Entry Plant Quarantine Center No. 2, Plant Protection Department, Ministry of Agriculture and Rural Development（MARD）で累代飼育されているセグロモモミバエが我が国に導入された。なお，MARD が累代飼育している本種はベトナムの Dong Nai Province, Tien Giang Province および Dong Thap Province で採集されたものに由来する。これらの province は Phan Thiet City（緯度，10°93'N；経度，108°10'E；標高，8m）の近隣に位置する。Phan Thiet City では，2017 年 7 月から 2019 年 6 月までの最も低い月平均気温が 2019 年 1 月の 26.2℃で，最も高い月平均気温が 2018 年 5 月の 29.6℃であった（気象庁, 2019）。

我が国への本種の導入後，横浜植物防疫所調査研究部の飼育施設内に設置された大型スクリーンケージで本種は飼育され，飼育施設は一定条件（温度：26±1℃，相対湿度：60±10%，光周期：明期 14 時間および暗期 10 時間，薄明薄暮期：明期の最初と最後の 1 時間）で維持された。本研究を行った際，ベトナムで 6 年以上，日本で 4 年以上の累代飼育期間，つまり，ベトナムでの本種の採集後，10 年以上が経過しており，日本での累代飼育世代数は 30 世代以上であった。幼虫には，人工飼料として，水 160mL，3.5%塩酸 5mL，ソルビン酸 0.19g，乾燥酵母（Ebios, Asahi Food & Healthcare, Japan）12.5g，砂糖 8.8g，トイレットペーパー 6.3g，および小麦ふすま 43.8g の混合物を与えた。成虫には，加水分解酵母（AY-65, Asahi Food & Healthcare, Japan）とグラニュー糖を 1：4 の割合で混合したものを与え，給水のために水寒天を与えた。

3.2.2 生存率，発育期間および産卵前期間の調査を実施した人工気象装置

横浜植物防疫所調査研究部に設置された人工気象装置（KOITOTRON-KG-50HLASP, Koito Electric Industries, Japan）の温度が，19，22，25，28 または $31 \pm 1^{\circ}\text{C}$ の一定温度に設定された後，本装置内で後述の生存率，発育期間および産卵前期間の調査を実施した。本装置は一定条件（相対湿度： $60 \pm 10\%$ ，光周期：明期 14 時間および暗期 10 時間，薄明薄暮期：明期の最初と最後の 1 時間）で維持された。

3.2.3 卵の生存率および発育期間の調査

Ohto et al. (1991) によって考案されたウリミバエおよびミカンコミバエ用の大型採卵容器を使用して採卵した。採卵の際，本容器に少量のレモンジュースを入れ，容器側面にレモンジュースを塗り付け，本容器に蓋をした。その後，明期における薄明薄暮期を除く時間帯の中の 50 分間，飼育施設に設置した大型スクリーンケージ内の既交尾成熟雌を含むセグロモモミバエのコロニーに本容器を暴露した。次に，直径 9cm のガラスシャーレに湿らせたろ紙を入れ，その上に敷いたガーゼの上に採卵された 100 卵を置き，シャーレに蓋をした。その後，人工気象装置内に本シャーレを置き 1 時間ごとに孵化した卵数を記録した。

3.2.4 幼虫の生存率および発育期間の調査

直径 100 mm，深さ 43 mm のプラスチック製アイスクリームカップに幼虫の人工飼料 30g を入れた。面相筆を使って人工飼料の上に 1 カップあたり 20 頭の幼虫を移した。幼虫は孵化後 1 時間以内のものを供試した。次に，人工気象装置

内に本アイスクリームカップを置いた後、蛹化のために人工飼料から飛び出した幼虫の数を 1 時間ごとに記録した。

3.2.5 蛹の生存率および発育期間の調査

直径 9cm のプラスチックシャーレに滅菌済みの砂を入れ、面相筆を使って砂の上に人工飼料から飛び出した幼虫を移した。次に、人工気象装置内に本プラスチックシャーレを置いた。その後、羽化したミバエの数を 1 時間ごとに記録した。

3.2.6 産卵前期間の調査

まず、成虫羽化日の午前中、小型スクリーンケージ（15 × 15 × 22 cm）内に 0 日齢雄 2 頭および 0 日齢雌 1 頭を放飼し、人工気象装置内に本ケージを設置した。本ケージ内に成虫の人工飼料および給水用の水寒天を入れた。次に、5 日齢（羽化後 5 日目）以降、毎日、午前 10 時から午後 5 時までの間、本ケージ内に小型採卵容器を設置した。採卵容器を回収後、シャーレに湿らせたろ紙を置き、その上にガーゼを敷き、ガーゼの上に採卵容器で採卵した卵を置きシャーレの蓋をした。飼育施設内に本シャーレを置き 2 日間保管した後、卵の孵化を確認した。

3.2.7 データの解析

統計ソフト R (R Core Team, 2019) を使用して、 χ^2 test を行った後、Ryan's multiple range test を行うことによって生存率を解析した。また、統計ソフト R (R Core

Team, 2019) を使用して, Tukey-Kramer test を行うことによって発育期間および産卵前期間を解析した。卵期間, 幼虫期間, 蛹期間, 卵から成虫羽化までの期間, 産卵前期間および一世代期間における T_0 および K を推定するため, Ikemoto-Takai モデルに基づく式である「 $DT = K + T_0D$ 」(Ikemoto and Takai, 2000; 池本・高井, 2001) を使用した。 D は発育期間, T は温度を示す。また, 決定係数 (R^2) も推定した。従来の研究ではミバエの T_0 および K を推定するため, 有効積算温度法則に基づく式である「 $1/D = -T_0/K + (1/K)T$ 」が使用されている。しかし, 本研究で Ikemoto-Takai モデルに基づく式である「 $DT = K + T_0D$ 」を使用した理由は, 「 $1/D = -T_0/K + (1/K)T$ 」を使用することで生ずる問題, すなわち, (1) 高温部のデータが重要視され低温部のデータがほとんど無視されるという問題, および (2) 測定温度の誤差が無視されるため T_0 は小さく K は大きく推定されるという問題が解消されるためである (Ikemoto and Takai, 2000; 池本・高井, 2001)。また, 温度測定装置 (Koito Electric Industries, Japan) および PC レコーダソフトウェア (MSR128, M-System, Japan) を使用して 10 分ごとに人工気象装置内の温度を測定した。その結果, 温度測定装置で測定した人工気象装置内温度の平均値は設定温度 (19, 22, 25, 28 または 31°C) と $\pm 1^\circ\text{C}$ の範囲内で異なっていた。そこで, T_0 および K をより正確に推定するため, 温度測定装置で測定した温度の平均値に基づき計算を行った。

我が国におけるセグロモモミバエの発育・生殖可能月を推定するため, 気象庁のウェブサイト (気象庁, 2019) から, 我が国の 6 地点, すなわち, 札幌 (緯度, $43^\circ 3.6' \text{N}$; 経度, $141^\circ 19.7' \text{E}$; 標高, 17m), 東京 (緯度, $35^\circ 41.5' \text{N}$; 経度, $139^\circ 45.0' \text{E}$; 標高, 25m), 福岡 (緯度, $33^\circ 34.9' \text{N}$; 経度, $130^\circ 22.5' \text{E}$; 標高, 3m), 鹿児島 (緯度,

31°33.3'N; 経度, 130°32.8'E; 標高, 4m), 奄美 (緯度, 28°22.7'N; 経度, 129°29.7'E; 標高, 3m) および那覇 (緯度, 26°12.4'N; 経度, 127°41.2'E; 標高, 28m) における 1981 年から 2010 年までの月ごとの平均気温データを得た。平均気温データが卵から成虫羽化までの T_0 よりも高い月を発育可能月として, 平均気温データが産卵前期間の T_0 よりも高い月を生殖可能月として, それぞれ定義した。また, 一世代期間の T_0 および K に基づいて, 上述の 6 地点における年間発生世代数を推定した。

3.3 結果

3.3.1 生存率

Table 3.1 に, 測定温度の平均値, 卵, 幼虫および蛹の供試虫数, ならびに生存率を示す。卵の生存率 (孵化率) は 28°C の 86.0% から 22°C の 89.3% までの範囲であり各温度の生存率 (孵化率) に有意な差はなかった (Ryan's multiple range test for proportions after χ^2 test, $p > 0.05$)。幼虫の生存率は 19°C の 40.2% から 28°C の 96.6% までの範囲であった。幼虫の最も低い生存率である 19°C の 40.2% は他の温度と有意な差があった (Ryan's multiple range test for proportions after χ^2 test, $p < 0.05$)。幼虫の 2 番目に低い生存率である 22°C の 70.9% も他の温度と有意な差があった (Ryan's multiple range test for proportions after χ^2 test, $p < 0.05$)。一方, 25°C, 28°C および 31°C の生存率に有意な差はなかった (Ryan's multiple range test for proportions after χ^2 test, $p > 0.05$)。また, 試験の中で 3 齢幼虫と考えられる幼虫の死亡個体を確認することはできなかった。蛹の生存率は 22°C の 90.4% から 28°C の 97.3% までの範囲であり各温度の生存率に有意な差はなかった (Ryan's

multiple range test for proportions after χ^2 test, $p > 0.05$)。

3.3.2 発育期間および産卵前期間

卵の発育期間を採卵した時刻から孵化を確認した時刻までの期間として、幼虫の発育期間を人工飼料に幼虫を移した時刻から蛹化のために人工飼料から幼虫が飛び出した時刻までの期間として、蛹の発育期間を人工飼料から幼虫が飛び出した時刻から成虫が羽化した時刻までの期間として、産卵前期間を成虫の羽化日から受精卵の産卵日までの期間として、それぞれ定義した。

Table 3.2 に、測定温度の平均値、卵、幼虫および蛹の供試虫数、産卵前期間調査の反復数、ならびに発育期間および産卵前期間を示す。卵の発育期間は 19℃の 3.19 日から 31℃の 1.06 日までの範囲であり、19℃から 31℃までの温度の増加に伴い発育期間は有意に減少した (Tukey-Kramer test, $p < 0.05$)。幼虫の発育期間は 19℃の 11.30 日から 31℃の 4.01 日までの範囲であり、19℃から 31℃までの温度の増加に伴い発育期間は有意に減少した (Tukey-Kramer test, $p < 0.05$)。蛹の発育期間は 19℃の 22.15 日から 31℃の 8.01 日までの範囲であり、19℃から 31℃までの温度の増加に伴い発育期間は有意に減少した (Tukey-Kramer test, $p < 0.05$)。産卵前期間は 19℃の 28.54 日から 31℃の 10.57 日までの範囲であり、19℃から 25℃までの温度の増加に伴い産卵前期間は有意に減少した (Tukey-Kramer test, $p < 0.05$)。その一方、25℃から 28℃までの温度の増加に伴い産卵前期間はわずかに増加したが、これらの産卵前期間に有意な差はなかった (Tukey-Kramer test, $p > 0.05$)。また、28℃から 31℃までの温度の増加に伴い産卵前期間は減少したが、これらの産卵前期間に有意な差はなかった (Tukey-Kramer test, $p > 0.05$)。

3.3.3 T_0 , K および R^2

Table 3.3 に T_0 , K および R^2 を示す。 T_0 (°C) は, 卵期間, 幼虫期間, 蛹期間, 卵から成虫羽化までの期間, 産卵前期間および一世代期間において, それぞれ, 12.96, 12.17, 12.30, 12.30, 14.19 および 12.91 であった。 K (日度) は, それぞれ, 18.43, 72.60, 141.88, 233.22, 175.70 および 418.97 であった。 R^2 は, それぞれ, 0.998, 0.994, 0.995, 0.996, 0.954 および 0.982 であった。

3.3.4 発育・生殖可能月および年間発生世代数の推定

Fig. 3.1 に推定した発育・生殖可能月および年間発生世代数を示す。札幌において, 発育可能月は 5 月から 9 月まで, 生殖可能月は 6 月から 9 月までであることを推定した。東京において, 発育可能月は 4 月から 10 月まで, 生殖可能月は 5 月から 10 月までであることを推定した。福岡において, 発育可能月は 4 月から 11 月まで, 生殖可能月は 4 月から 10 月までであることを推定した。鹿児島において, 発育可能月は 3 月から 11 月まで, 生殖可能月は 4 月から 11 月までであることを推定した。奄美および那覇において, 発育・生殖可能月は 1 月から 12 月まで, すなわち, 発育・生殖が周年可能であることを推定した。推定した年間発生世代数は, 札幌, 東京, 福岡, 鹿児島, 奄美および那覇において, それぞれ, 1.90, 4.01, 4.89, 5.72, 7.66 および 8.85 であり, 緯度の減少に伴い年間発生世代数は増加した。

3.4 考察

19°C から 31°C までの温度の範囲で卵および蛹の生存率に有意な差はなかった。

一方で、19℃および22℃の幼虫の生存率は、25℃、28℃および31℃より有意に低かった。本研究で推定した幼虫の T_0 は 12.17℃であり、19℃および22℃よりも低い。このため、推定した T_0 より高い温度でも多くの個体が発育できず死亡すると考えられる。本研究で示した生存率は Liu and Ye (2009) の報告と近似している。また、幼虫の生存率調査で3齢幼虫の死亡個体を確認できなかった。このことから、19℃および22℃における幼虫の生存率は若齢幼虫の死亡により低くなっていると推定される。

各ステージの発育期間および産卵前期間は、19℃から31℃までの温度の増加に伴い減少した。本研究で示した発育期間および産卵前期間の減少傾向は Liu and Ye (2009) の報告と近似している。その一方で、本研究で示した幼虫の発育期間および産卵前期間は、Liu and Ye (2009) の報告と比較して、かなり短い。例えば、本研究における25℃での幼虫発育期間平均値は5.30日、産卵前期間平均値は12.62日であったが、Liu and Ye (2009) における24℃での幼虫発育期間平均値は12.05日、産卵前期間平均値は38.75日であった。ミカンコミバエまたはウリミバエを供試した試験において、幼虫の発育期間および産卵前期間は摂食した餌によって変化することが報告されている (Iwaizumi et al., 1994; 中原ら, 2011)。そこで、Liu and Ye (2009) の報告に記載された幼虫の人工飼料と概ね同様のものを使用してベトナム産セグロモモミバエが飼育された。その結果、Liu and Ye (2009) の人工飼料と同様のもので飼育されたベトナム産本種幼虫の発育期間と、本研究で示した同期間に有意な差はなかった (荒川・加土井, 未発表)。Liu and Ye (2009) によって供試された中国産セグロモモミバエは、中国の Yuanjiang, Yunnan Province で採集されている。気象庁 (2019) のウェブサイト

よると、中国の Yuanjiang, Yunnan Province (緯度, 23°60'N; 経度, 101°98'E) における 1981 年から 2010 年までの月平均気温は 12 月の 17.6°C から 6 月の 30.0°C までの範囲であった。また、同じく気象庁 (2019) のウェブサイトによると、本研究で供試したベトナム産本種の採集地に近い Phan Thiet City (緯度, 10°93'N; 経度, 108°10'E) における 2017 年 7 月から 2019 年 6 月までの最低月平均気温が 2019 年 1 月の 26.2°C で、最高月平均気温が 2018 年 5 月の 29.6°C であった。これらの 2 地点の上記のデータでは最低月平均気温 (中国: 17.6°C, ベトナム: 26.2°C) が大きく異なっている。このため、Liu and Ye (2009) と本研究で供試した幼虫の発育期間および産卵前期間の大きな違いは、採集地の生息環境の違いに起因する個体群間の遺伝子の違いによって生じた可能性もある。また、実験室における累代飼育世代数、飼育環境への適応程度および試験方法の差も大きく影響しているかもしれない。

従来の研究では、様々な条件で実施された試験に基づき重要なミバエの T_0 および K が推定されている。例えば、佐伯ら (1980) および Vargas et al. (1996) によってミカンコミバエの T_0 および K が、奥村ら (1981) および Vargas et al. (1996) によってウリミバエの T_0 および K が、それぞれ報告されている。本研究とこれまでの研究を概括的に比較するため、本研究とこれまで報告された重要ミバエの T_0 および K を Table 3.4 に示す。

本研究以外のこれまでの報告において T_0 および K は有効積算温度法則の式である「 $1/D = -T_0/K + (1/K) T$ 」を使用して算出されていることを考慮して、Table 3.4 に示した本研究の T_0 および K も「 $1/D = -T_0/K + (1/K) T$ 」を使用して算出したものを示した。このため、Table 3.4 で示した値は Table 3.3 で示した値と異なっ

ている。さて、本研究の T_0 および K の値は、Liu and Ye (2009) で報告された値と著しく異なっていた。本研究と Liu and Ye (2009) で報告された値の差は、卵期間、幼虫期間、蛹期間および産卵前期間で、 T_0 において、それぞれ 4.11, 3.92, 2.26 および 3.08, K において、それぞれ 7.25, 123.08, 17.45 および 133.30 であった。一般的に、 T_0 は種特異的に安定した値であるが、 K はある範囲までは可変的で世代数の増加などは K の値を小さくすることで実現されると考えられている (桐谷, 2012)。その一方で、 T_0 が同種内で著しく異なっていることを示すいくつかの報告がある。例えば、Table 3.4 に示したとおり、Vargas et al. (1996) と佐伯ら (1980) によって報告されたミカンコミバエ幼虫の T_0 に 6.25°C の差がある。これらの差は、採集地の生息環境の違いに起因する個体群間の遺伝子の違いによって生じた可能性もあるだろう。また、実験室における累代飼育世代数、飼育環境への適応程度および試験方法の差も大きく影響していると考えられる。そこで、ベトナム産セグロモモミバエと中国産本種の T_0 または K の差がどのような要因で引き起こされたのかを明らかにするため、同様の試験方法で、これらの個体群の発育期間および産卵前期間を調査し、これらに基づく T_0 および K を明らかにすることが望まれる。

Table 3.4 に示したとおり、ベトナム産セグロモモミバエの卵期間、幼虫期間および蛹期間の T_0 は、ミカンコミバエおよびウリミバエより全体的に高く、我が国が侵入を警戒している経済的に重要なミバエであるモモミバエ *Bactrocera zonata* (Saunders) より低かった。このことから、モモミバエと比較して、ベトナム産セグロモモミバエは、より低温の地域で発育が可能であると推定される。

本研究で示した T_0 に基づき、日本の 6 地点 (札幌, 東京, 福岡, 鹿児島, 奄

美および那覇)におけるベトナム産セグロモモミバエの発育・生殖可能月を推定した (Fig. 3.1)。その結果、奄美および那覇で周年の発育および生殖が可能であると推定された。さて、理論上、昆虫は T_0 以下の温度で発育を停止する。一方、 T_0 は昆虫を即座に死亡させる温度ではないため、 T_0 以下の温度でもセグロモモミバエは長期間、生存できるかもしれない。また、野外では気温が常に変動していることにも留意する必要があるだろう。Takano (2014) は、ナスミバエの雌成虫を供試して、低温である 12°C の一定温度条件で維持した本種の生存率と変温条件 ($11^{\circ}\text{C}22$ 時間/ $20^{\circ}\text{C}2$ 時間) で維持した本種の生存率を比較した。その結果、変温条件での生存率は 12°C の一定温度条件と比較して著しく高かったことを報告した。Takano (2014) の報告を考慮すると、本研究で、周年の発育・生殖が可能であると推定されなかった鹿児島以北の地域における変温条件でセグロモモミバエが越冬できる可能性も十分にある。そこで、本種を供試して鹿児島以北における気温の変動をシミュレートした温度条件で越冬可否を調査することも重要である。

本研究で日本の 6 地点における年間発生世代数を推定した。その結果、年間発生世代数の多い 2 地域は奄美および那覇で、その世代数はそれぞれ 7.66 および 8.85 であった (Fig. 3.1)。佐伯ら (1980) は、かつて我が国の南西諸島に発生していたミカンコミバエの奄美および那覇における年間発生世代数を 8 と推定した。また、奥村ら (1981) は、同じくかつて南西諸島に発生していたウリミバエの奄美および那覇における年間発生世代数をそれぞれ 8 および 9 と推定した。以上によれば、本研究で推定したベトナム産セグロモモミバエの奄美および那覇における年間発生世代数はミカンコミバエおよびウリミバエと近似している。

従って、ベトナム産セグロモモミバエが南西諸島に侵入した場合、ミカンコミバエおよびウリミバエと同様、急速に分布を広げていくおそれがある。

これまで、ベトナム産セグロモモミバエの T_0 および K 、発育期間および産卵前期間ならびに生存率は報告されていなかった。本研究は、これらを明らかにしたことに加え、我が国での本種の発育・生殖可能月および年間発生世代数も推定した。今後、本研究で推定したベトナム産本種の T_0 および K に基づいて本種の世代期間を推定し、本世代期間を根拠とした本種の効果的な定着防止措置としての我が国における根絶防除計画の策定を行うことが望まれる。また、南西諸島では年間を通して本種の発育・生殖が可能であり、年間発生世代数はかつて我が国に発生していた最重要害虫のミカンコミバエおよびウリミバエと同様であると予測されたことを勘案し、本種の効果的・効率的な侵入定着防止措置としての南西諸島における早期発見に役立つモニタリングトラップ調査の強化を検討することが必要である。

また、同種のミバエであっても採集した地域が異なる場合、 T_0 および K が異なっているかもしれない。このため、前述のとおりベトナム産本種に次いで我が国の輸入植物検疫で多数の発見記録があり、我が国への侵入圧が高いと推測されるタイ産本種を供試して本研究と同様の方法で試験を行うことも重要である。しかし、日本の植物防疫法の規定によりタイ産本種を我が国に導入することは現実的に困難である。従って、タイにおける試験の実施が望まれる。

Table 3.1 Survival rates (%) of the egg, larva, and pupa of a Vietnamese population of *Bactrocera correcta* at 5 constant temperatures

Preset temperature (°C)	Egg			Larva			Pupa		
	Mean temperature measured \pm SE [†] (°C)	Tested number	Survival rate (%)	Mean temperature measured \pm SE (°C)	Tested number	Survival rate (%)	Mean temperature measured \pm SE (°C)	Tested number	Survival rate (%)
19 \pm 1	18.8 \pm 0.002	1,500	89.0	18.7 \pm 0.001	900	40.2 ^a	18.7 \pm 0.001	362	93.1
22 \pm 1	21.8 \pm 0.001	1,800	89.3	21.7 \pm 0.001	1,080	70.9 ^b	21.7 \pm 0.001	643	90.4
25 \pm 1	25.2 \pm 0.005	1,800	89.1	25.2 \pm 0.003	1,260	96.1 ^c	25.2 \pm 0.003	1,039	96.2
28 \pm 1	27.7 \pm 0.002	1,500	86.0	27.7 \pm 0.001	1,080	96.6 ^c	27.7 \pm 0.001	867	97.3
31 \pm 1	30.9 \pm 0.005	1,800	89.3	30.9 \pm 0.003	1,260	96.3 ^c	31.0 \pm 0.003	1,043	93.9

[†]SE, standard error; values followed by different letters in the same column are significantly different (Ryan's multiple range test for proportions after χ^2 test, $p < 0.05$)

Table 3.2 Mean developmental periods of the egg, larva, pupa, and preoviposition of a Vietnamese population of *B. correcta* at 5 constant temperatures

Preset temperature (°C)	Egg			Larva			Pupa			Preoviposition		
	Mean temperature measured ± SE† (°C)	Tested number	Mean ± SE (days)	Mean temperature measured ± SE (°C)	Tested number	Mean ± SE (days)	Mean temperature measured ± SE (°C)	Tested number	Mean ± SE (days)	Mean temperature measured ± SE (°C)	Tested number	Mean ± SE (days)
19 ± 1	18.8 ± 0.002	1,304	3.19 ± 0.005 ^a	18.7 ± 0.001	343	11.30 ± 0.055 ^e	18.7 ± 0.001	319	22.15 ± 0.067 ^a	19.6 ± 0.003	13	28.54 ± 3.025 ^a
22 ± 1	21.8 ± 0.001	1,533	2.11 ± 0.003 ^b	21.7 ± 0.001	728	7.35 ± 0.022 ^b	21.7 ± 0.001	579	15.16 ± 0.028 ^b	22.3 ± 0.005	14	24.57 ± 3.401 ^{ab}
25 ± 1	25.2 ± 0.005	1,548	1.45 ± 0.002 ^c	25.2 ± 0.003	1,149	5.30 ± 0.013 ^c	25.2 ± 0.003	939	10.50 ± 0.018 ^c	25.7 ± 0.001	13	12.62 ± 0.931 ^{bc}
28 ± 1	27.7 ± 0.002	1,276	1.24 ± 0.001 ^d	27.7 ± 0.001	967	4.81 ± 0.003 ^d	27.7 ± 0.001	788	9.03 ± 0.007 ^d	28.7 ± 0.006	13	13.54 ± 1.608 ^{bc}
31 ± 1	30.9 ± 0.005	1,603	1.06 ± 0.001 ^e	30.9 ± 0.003	1,158	4.01 ± 0.005 ^e	31.0 ± 0.003	933	8.01 ± 0.008 ^e	31.7 ± 0.004	14	10.57 ± 0.542 ^c

†SE, standard error; means followed by different letters in the same column are significantly different (Tukey-Kramer test, $p < 0.05$)

Table 3.3 Lower thermal threshold (T_0), effective cumulative temperature (K), and coefficient of determination (R^2) for each stage of a Vietnamese population of *B. correcta*

Stage	T_0 ($^{\circ}\text{C}$) \pm SE [†]	K (day-degrees) \pm SE	R^2
Egg	12.96 \pm 0.32	18.43 \pm 0.62	0.998
Larva	12.17 \pm 0.53	72.60 \pm 3.75	0.994
Pupa	12.30 \pm 0.51	141.88 \pm 7.18	0.995
Egg to adult emergence	12.30 \pm 0.45	233.22 \pm 10.40	0.996
Preoviposition	14.19 \pm 1.76	175.70 \pm 34.10	0.954
Egg to oviposition (one generation period)	12.91 \pm 1.00	418.97 \pm 42.12	0.982

[†]SE, standard error; parameters were calculated using the Ikemoto-Takai model [$\text{DT} = K + T_0\text{D}$] and mean values of the measured temperatures rather than the preset temperatures

Table 3.4 Comparison between the previous and present studies of T_0 and K for each stage of *Bactrocera* species

Scientific name of <i>Bactrocera</i> species	Author (year)	T_0 (°C)				K (day-degrees)			
		Egg	Larva	Pupa	Preoviposition	Egg	Larva	Pupa	Preoviposition
<i>Bactrocera dorsalis</i> (Hendel)	Vargas <i>et al.</i> (1996)	11.80	5.60	9.30	–	21.10	160.80	176.10	–
	Saeiki <i>et al.</i> (1980)	11.65	11.85	11.00	15.13	22.87	85.06	163.49	148.48
<i>Bactrocera cucurbitae</i> (Coquillett)	Vargas <i>et al.</i> (1996)	10.10	6.60	9.40	–	18.50	124.40	152.50	–
	Okumura <i>et al.</i> (1981)	10.30	9.41	10.59	12.08	18.03	108.15	150.35	183.02
<i>Bactrocera zonata</i> (Saunders)	Duyck <i>et al.</i> (2004)	12.70	12.60	12.80	–	25.00	68.00	131.00	–
<i>Bactrocera correcta</i> (Bezzi)	Liu and Ye (2009)	8.50	7.60	9.50	15.70	26.30	200.00	166.70	333.30
	The present study	12.61	11.52	11.76	12.62	19.05	76.92	149.25	200.00

All values, including those of the present study, were calculated using the common linear equation $[1/D = -T_0/K + (1/K) T]$ rather than the Ikemoto-Takai model $[DT = K + T_0D]$

Location	Latitude	The estimated number of annual generations	Development or reproduction	Month											
				Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May	Jun.	Jul.	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.
Sapporo	43°3.6'N	1.90	Monthly mean temperature	-3.6	-3.1	0.6	7.1	12.4	16.7	20.5	22.3	18.1	11.8	4.9	-0.9
			development												
			reproduction												
Tokyo	35°41.5'N	4.01	Monthly mean temperature	6.1	6.5	9.4	14.6	18.9	22.1	25.8	27.4	23.8	18.5	13.3	8.7
			development												
			reproduction												
Fukuoka	33°34.9'N	4.89	Monthly mean temperature	6.6	7.4	10.4	15.1	19.4	23	27.2	28.1	24.4	19.2	13.8	8.9
			development												
			reproduction												
Kagoshima	31°33.3'N	5.72	Monthly mean temperature	8.5	9.8	12.5	16.9	20.8	24.0	28.1	28.5	26.1	21.2	15.9	10.6
			development												
			reproduction												
Amami	28°22.7'N	7.66	Monthly mean temperature	14.8	15.2	17.1	19.8	22.7	26.0	28.7	28.4	26.8	23.7	20.2	16.5
			development												
			reproduction												
Naha	26°12.4'N	8.85	Monthly mean temperature	17.0	17.1	18.9	21.4	24.0	26.8	28.9	28.7	27.6	25.2	22.1	18.7
			development												
			reproduction												


 : Estimated potential month of development and reproduction

Fig. 3.1 Potential months of development and reproduction and numbers of annual generations of a Vietnamese population of *Bactrocera correcta* at 6 places in Japan. I defined the potential months of development and reproduction as when the mean temperatures were higher than lower thermal threshold (T_0). For development, T_0 from egg to adult emergence was used and for reproduction, T_0 for preoviposition was used. For the estimated numbers of annual generations, both T_0 and effective cumulative temperature (K) from egg to oviposition (for one generation period) were used. T_0 and K were estimated using the Ikemoto-Takai model [$DT = K + T_0D$]. The monthly mean temperatures (1981-2010) were obtained from the website of the Japan Meteorological Agency (2019)

第4章 セグロモミバエ雄の性成熟および齢に関係した β -カリオフィレン またはメチルオイゲノールへの反応

4.1 緒言

第3章で示したとおり、セグロモミバエが我が国に侵入した場合、かつて我が国に定着していたミカンコミバエおよびウリミバエと同様、我が国に定着する可能性が高い。また、我が国に本種が侵入定着した場合、果実生産に被害が生じるだけでなく国内外への果実流通規制等の植物検疫措置が実施される可能性がある。このため、本種侵入時の経済的被害を最小限にするためには早期に侵入が検出できる侵入警戒調査を実施する必要がある。また、万が一、本種が侵入定着した場合、迅速に有効な根絶防除を実行しなければならない。これらの理由から本種に対する効果的・効率的な侵入警戒調査および根絶防除技術の確立が望まれる。このためには強力な誘引剤の開発が重要である。

根絶防除技術の一つである雄除去法は、誘引剤を使用したトラップを大量に配置して雄の除去を一定期間継続することによって雌の交尾機会をなくし根絶・防除を図るものである (IAEA, 2018; 石井ら, 1985)。なお、雄除去法での根絶成功の要件は性成熟前の雄が誘引剤に反応することである (Iwahashi et al., 1996; 岩橋, 1998; Wong et al., 1989)。かつて南西諸島に発生していたミカンコミバエは、雄が性成熟前に ME に反応するため (Shelly et al., 2008)、ME を利用した雄除去法によって根絶された (吉澤, 1993; Yoshizawa, 1997)。その一方で、性成熟前のウリミバエ雄は本種の誘引剤であるキュウルアに反応しない (Wong et al., 1991)。このため、本種の根絶のため不妊虫放飼法が実施されてきた。この方

法は、放射線で不妊化した雄を野外に放飼し野生雌と交尾させることにより受精卵の産卵を抑制し、次世代以降の野生虫を減少させる根絶防除技術である。この方法で、かつて南西諸島に発生していたウリミバエが根絶された（石井ら, 1985 ; 吉澤, 1993; Yoshizawa, 1997）。雄除去法は不妊虫放飼法と比較して安価で簡便な方法である。また、雄除去法に有効な誘引剤は侵入警戒調査のためのモニタリングトラップ調査にも有効であると考えられる。

ME を摂食したミカンコミバエ雄は、直腸に存在する直腸腺にその代謝物質を蓄積し（Nishida et al., 1988）、雌を誘引するための性フェロモンとして放出することが報告されている（Hee and Tan, 1998）。そこで、Tokushima et al. (2010) は、セグロモミバエ雄の直腸腺内に蓄積された物質およびこの物質の本種に対する誘引性を明らかにするため以下の調査を行った。なお、本種雄は ME に誘引されることがよく知られている（Drew and Romig, 2013; White and Elson-Harris, 1992）。まず、本種野生雄の直腸腺内における物質を明らかにするため、タイにおいて野外に設置した ME トラップで捕獲された野生雄直腸腺内の物質を調査した。その結果、ME の代謝物質および多量のセスキテルペン、すなわち、CAR, α -フムレン等が検出された。この中で最も平均検出量が多かったものは CAR であった。次に、本種野生雄の直腸腺から検出されたセスキテルペンの誘引性を調査するため、タイにおいて野外に CAR と α -フムレンの混合物を誘引源としたトラップを設置した結果、本トラップで本種雄が捕獲された。併せて、本種雄によるセスキテルペンの蓄積を調査するために、CAR および α -フムレンを含む混合物を摂食させた累代飼育雄ならびに本混合物未摂食の累代飼育雄における虫体内化学物質の調査を行った結果、摂食雄から CAR および α -フムレンが検出

された一方、未摂食雄からは検出されなかった。従って、本種雄は CAR, α -フムレン等のセスキテルペンを野外で探索・摂食し虫体内に蓄積していると考えられた。そこで、CAR 単独の本種に対する誘引性を ME と比較するため、2013 年に、タイ国内で野外の 3 地点に CAR または ME を誘引剤とするトラップが設置され捕獲されたミバエの数が調査された。その結果、CAR および ME トラップは雄のみを誘引し CAR トラップでの本種雄の総捕獲数は ME の 7.2 倍であった。よって、CAR は本種雄に有効な誘引剤である可能性がある (Wee et al., 2018)。

これまで、セグロモモミバエの雄除去法に最適な誘引剤は報告されていない。一方、上述の報告に基づく CAR は本種雄に有効な誘引剤である可能性がある。また、雄除去法による根絶成功の要件は性成熟前の雄が誘引剤に反応することである。これらを考慮して、本種の雄除去法および侵入警戒調査における CAR および ME の有効性を評価するため、植物防疫所で飼育しているベトナム産本種の長期累代飼育虫を供試して雄の性成熟日齢および CAR または ME 使用簡易トラップにおける各日齢の雄捕獲率を調査した。

4.2 材料および方法

4.2.1 供試虫

第 3 章で示したベトナム産セグロモモミバエを供試した。本研究を行った際、ベトナムで 6 年以上、日本で 6 年以上の累代飼育期間、つまり、ベトナムでの採集後、12 年以上が経過しており日本における累代飼育世代数は 40 世代以上であった。

4.2.2 雄の性成熟日齢

現在、雄の形態に基づいて性成熟日齢を明らかにする技術は確立されていない。このため、成熟雌を調査対象の雄のグループと一緒に維持して、24 時間後に雌を取り出し、その雌が受精卵を産卵するか否かを調査することにより雄の性成熟日齢を推定した。

横浜植物防疫所調査研究部の飼育施設において雄の性成熟日齢を調べるための試験を行った。飼育施設の光周期は、明期 14 時間および暗期 10 時間で、また、明期の最初と最後の 1 時間は、それぞれ薄明期および薄暮期として、維持された。

はじめに、雄の羽化日である 0 日目（雄 0 日齢）の午前中に、成虫の人工飼料および水寒天を入れた小型スクリーンケージ内に、羽化直後の 0 日齢雄 10 頭および 30 日齢を超えた未交尾成熟雌 5 頭を放飼した。成熟雌を供試した理由は雌の性成熟の影響を取り除くためである。続いて、6 日目の午前中に、このケージから雌 5 頭を取り出し、雄を放飼していない別の小型スクリーンケージに移した。これらの雌は、前日の 5 日目（雄 5 日齢）における明期最後の薄暮期に、雄と一緒に維持したものである。なお、ミバエの交尾は薄暮期に行われる（Christenson and Foote, 1960）。その後、6 日目の午前中に、6 日齢雄 10 頭を入れている最初の雌 5 頭を取り出した小型スクリーンケージに、別の未交尾成熟雌 5 頭を放飼し 1 日間維持した。同様に、14 日目まで、毎日午前中に、小型スクリーンケージで雄と一緒に維持していた雌 5 頭と別の未交尾成熟雌 5 頭を入れ替えた。そして、最終日である 15 日目の午前中に、前日の 14 日目（雄 14 日齢）の薄暮期に 14 日齢雄と一緒に維持した雌 5 頭を、別の小型スクリーンケ

ジに移した。雄を放飼していない別の小型スクリーンケージに、雄と一緒に維持した雌を移した後、小型採卵容器、成虫の人工飼料および水寒天を入れ、3週間、毎日採卵を行った。採卵した卵における孵化の有無を確認するため、シャーレ内に水で湿らせた濾紙を置き、その上に敷いたガーゼに卵を置きシャーレに蓋をした後、25℃に設定した飼育施設で3日間維持した。その後、孵化の有無を確認した。なお、本試験方法の理解を助けるため Fig.4.1 に本方法に係る概略図を示す。

さて、ある雌が受精卵を産卵し、明期最後の薄暮期時点で7日齢雄とこれらの雌と一緒に維持していた場合、「7日齢」で、これらの小型スクリーンケージに放飼していた雄は性成熟に到達したとみなした。ただし、この場合、薄暮期時点で、同じケージにおいて5日齢および6日齢雄と一緒に維持していた雌は受精卵を産卵していない。すなわち、受精卵産卵雌と一緒に維持した雄の最も若い日齢で「雄は性成熟に到達した」と判断した。なお、交尾が薄暮期に行われることを考慮し、本時点における雄の日齢を性成熟到達日齢とした。また、予備試験において4日齢よりも若齢の雄と同一の小型スクリーンケージで維持した未交尾成熟雌は受精卵の産卵を行わないことを確認している。そのため、1-4日齢までの雄は性成熟に到達していないとみなした。全15ケージ（15反復）の結果に基づき、各日齢雄の性成熟率を「 $100 \times \text{性成熟に到達した雄を含むケージの累積数} / 15$ （全ケージ数）」として算出した。

飼育施設の温度（ $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ）および相対湿度（ $60 \pm 10\%$ ）は一定条件で維持された。

4.2.3 雄日齢とトラップへの誘引の関係

本研究で使用した簡易トラップ (Fig. 4.2) の詳細は次のとおりである。はじめに、(1) パラフィルム (Bemis Flexible Packaging, USA) でガラスの漏斗と 200mL の三角フラスコを接続した。次に、(2) マイクロピペットを使用して漏斗の脚内壁に 5 μ L の CAR または ME を塗布した。漏斗の円錐部の最大直径は約 90mm, 脚の長さは約 60mm, 脚の外径は約 9mm, そして, 脚の内径は約 6mm である。捕獲試験に供試した雄の日齢は 1-14 日齢または 30 日齢を超えた日齢であった。まず, 捕獲試験を実施する大型スクリーンケージ内環境への順化を目的として, 捕獲試験前日の午前中, 飼育施設に設置した大型スクリーンケージに雄 20 頭を放飼した。本ケージには成虫の人工飼料および水寒天が置かれた。次に, 翌日の捕獲試験実施日午前 9 時 30 分までに, 25 \pm 1 $^{\circ}$ C に維持した実験室に本ケージを移動した。午前 9 時 30 分, 本ケージ内に CAR または ME 使用簡易トラップおよびコントロールとしての CAR または ME 未使用簡易トラップを設置した。そして, 午前 10 時 30 分, トラップでの捕獲数を記録した。ミバエが漏斗の脚または三角フラスコの内部にいる場合のみ, これらの頭数を有効な捕獲数として記録した。1-14 日齢までの各日齢および 30 日齢を超えた日齢において, それぞれ 15 反復の試験を実施した。

4.2.4 データの解析

統計ソフト JMP バージョン 11 (SAS Institute, 2013) を使用して, 二項分布およびロジットリンクを使用した一般化線形モデル, つまり, ロジスティック回帰モデルによって雄捕獲の有無に関する雄日齢, 誘引剤 (CAR または ME) および

これらにおける相互作用の影響を解析した。雄日齢、誘引剤およびこれらの相互作用を独立変数とし、雄捕獲の有無を従属変数とした。さらに、上述のロジスティック回帰モデルで、各日齢（1-14 日齢または 30 日齢を超えた日齢）における CAR または ME を使用した簡易トラップでの雄捕獲予測確率も計算した。

4.3 結果および考察

Fig. 4.3 に雄の性成熟日齢を調査した試験の結果を示す。まず、15 ケージの中で、雄が性成熟に到達した最も若い日齢は 6 日齢で、最も遅い日齢は 13 日齢であった。次に、雄が性成熟に到達した日齢の全てのケージにおける平均は 8.8 日齢であった。そして、各日齢の性成熟率は、5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 および 13 日齢で、それぞれ 0.0, 6.7, 20.0, 46.7, 73.3, 86.7, 93.3 および 100.0%であった。ただし、本研究で雄が性成熟に到達し雌と交尾した場合であっても、交尾後の雌によって行われる受精に使用する精子の選択（cryptic female choice）や遺伝的不和合性（genetic incompatibility）のような要因のため、産卵された卵が孵化しない可能性がある。このため、雄の性成熟日齢を過大評価している可能性を完全に否定することはできない。一方で、特定のケージで 1 頭のみの雄が性成熟に到達することによって受精卵が得られた場合、そのケージの雄は性成熟に到達したとみなしているため、雄の性成熟日齢を過小評価している可能性が高い。従って、本研究で示した雄が性成熟に到達した日齢は必ずしも正確な値ではない。

Fig. 4.3 に CAR または ME 使用簡易トラップにおける各日齢雄の平均捕獲率を示す。また、Table 4.1 および Fig. 4.3 に雄捕獲の有無に関する雄日齢、誘引剤（CAR または ME）およびこれらの相互作用の影響を解析するために使用した

ロジスティック回帰の結果を示す。

雄日齢が 1 日齢から 4 日齢まで進行したとき CAR 使用トラップでの平均捕獲数（平均捕獲率）は 0.6 頭（3.0%）から 3.4 頭（17.0%）まで増加した。つまり、捕獲率は 20%より低かったが、1 日齢から 4 日齢までの全日齢において雄は CAR 使用トラップで捕獲された。次に、雄日齢が 5 日齢から 14 日齢まで進行したとき CAR 使用トラップでの平均捕獲数（平均捕獲率）は 5.9 頭（29.7%）から 18.1 頭（90.3%）まで増加した。そして、30 日齢を超えた平均捕獲数（平均捕獲率）は 18.8 頭（90.4%）であった。つまり、捕獲率は 5 日齢以降、急激に増加し 14 日齢および 30 日齢を超えた日齢で 90%を超えた。なお、全ての反復において CAR 使用トラップと同じケージに設置したコントロールトラップで雄は捕獲されなかった。

一方、ME 使用トラップでは、雄の 5 日齢まで雄は全く捕獲されず、6 日齢の平均捕獲数（平均捕獲率）は 0.1 頭（0.3%）であった。雄日齢が 7 日齢から 14 日齢まで進行したとき ME 使用トラップでの平均捕獲数（平均捕獲率）は、0.9 頭（4.7%）から 12.9 頭（64.7%）まで増加し、30 日齢を超えた平均捕獲数（平均捕獲率）は 14.8 頭（74.0%）であった。つまり、捕獲率は、7 日齢以降、徐々に増加し、30 日齢を超えた日齢で 74%であった。なお、全ての反復を通して ME 使用トラップと同じケージに設置したコントロールトラップで雄 1 頭のみが捕獲された。

ロジスティック回帰の結果は、雄捕獲の有無に関する雄日齢と誘引剤の影響が相互に作用することを示した（Table 4.1）。また、全ての供試日齢（1-14 日齢および 30 日齢を超えた日齢）で CAR 使用トラップにおける雄捕獲の予測確率

は常に ME より高かった。なお、CAR 使用トラップと ME 使用トラップにおける雄捕獲予測確率の差は雄日齢によって変化した (Fig. 4.3)。

雄が性成熟に到達する前の日齢である 5 日齢における CAR 使用トラップでの雄捕獲率は 29.7%で、ロジスティック回帰モデルによる捕獲予測確率は 30.6%であった。そして、最も若い性成熟日齢である雄 6 日齢における CAR 使用トラップでの捕獲率は 52.7%で、捕獲予測確率は 38.2%であった。一方で、雄 5 日齢まで ME 使用トラップでは雄は全く捕獲されず、雄 5 日齢における ME 使用トラップでの捕獲予測確率は 12.6%であった。そして、雄 6 日齢における ME 使用トラップでの捕獲率は 0.3%で、捕獲予測確率は 14.5%であった。本研究では、実験室条件において性成熟前のセグロモモミバエ雄が CAR 使用トラップで捕獲されるが、ME では全く捕獲されないことが明らかになった。Iwahashi et al. (1996), 岩橋 (1998) および Wong et al. (1989) は、雄除去法での根絶成功の要件が「性成熟前の雄が誘引剤に反応すること」であることを報告した。従って、CAR 使用トラップで性成熟前の本種雄が一定数捕獲されるため、CAR は ME より本種の雄除去法に有効な誘引剤である可能性がある。

Wong et al. (1986) は、ウリミバエ累代飼育虫が野生虫と比較して若齢で性成熟に到達することを報告し、実験室での長期累代飼育が飼育虫の生理的パターン等を狭い範囲に選抜する可能性を指摘した。本研究で供試したセグロモモミバエは実験室内で 12 年以上累代飼育されていた。このため、Wong et al. (1986) の報告におけるウリミバエ累代飼育虫と同様、本研究で供試したセグロモモミバエ累代飼育虫は野生虫と比較して若齢で性成熟に到達していたのかもしれない。なお、性成熟前の本種累代飼育雄における CAR への反応が、性成熟前の本

種野生雄と異なるといった現象がある場合、本種野生虫に本研究の結果を必ずしも適用できるとは限らない。このため、野生虫の性質に近いと考えられる短期累代飼育雄（以下、本稿では、便宜上「野生系統雄」と呼ぶ）を供試して、本研究と同様の試験を行うことも望まれる。

ME はセグロモミバエ雄の誘引剤としてよく知られているため、我が国に本種が侵入定着した場合、根絶防除のための雄除去法に ME を使用することが検討されるかもしれない。しかし、本研究は、実験室条件で CAR は性成熟前のセグロモミバエ雄を誘引した一方、ME は誘引しなかった結果に基づき、CAR が ME より本種の雄除去法に有効である可能性を示した。今後、本種の雄除去法における野外での CAR の有効性を評価するため、Shelly et al. (2008) および梅谷ら (1973) が示した野外ケージと同様のものを使用して、本研究と同様の試験を行い、CAR 使用トラップでの性成熟前雄の捕獲有無を調査することが望まれる。

ミカンコミバエの雄除去法に有効な誘引剤である ME は、本種のモニタリングにも有効な誘引剤として侵入警戒調査のためのトラップに使用されている。梅谷ら (1973) は、実験室内の試験に基づき、ME 使用トラップにおける 21 日齢ミカンコミバエ雄の捕獲率が 90%以上であったことを報告した。本研究では、CAR 使用トラップにおける 30 日齢を超えたセグロモミバエ雄の平均捕獲率が 90.4%であった。このため、本研究の結果は梅谷ら (1973) の報告と近似している。また、本研究において、CAR 使用トラップでのセグロモミバエ雄の平均捕獲率は ME を全ての日齢で上回った。そして、上述のとおり 2013 年に実施されたタイでの野外試験で、CAR 使用トラップによるセグロモミバエ雄の総捕獲数は ME の 7.2 倍であった (Wee et al., 2018)。これらを踏まえると、ミカン

コミバエのモニタリングに使用される誘引剤としての ME と同様，セグロモモ
ミバエのモニタリングに使用される誘引剤として CAR は有効であると推定され
るため，本種のモニタリングへの CAR の適用を検討することが望まれる。

Table 4.1 Results of logistic regression to analyze the effects of male age, attractant [β -caryophyllene (CAR) or methyl eugenol (ME)], and their interaction on the capture / non-capture of *Bactrocera correcta* males

Variables	Estimated parameter	df	Likelihood ratio χ^2	p
Intercept	-2.744	-	3874.5	< 0.001
Male age	0.161	1	2800.5	< 0.001
Attractant	0.231	1	1240.7	< 0.001
Male age \times attractant	0.178	1	174.9	< 0.001

Parameters in the model: $Y = 1 / [1 + \exp \{-(-2.744 + 0.161X1 + 0.231X2 + 0.178X1X2)\}]$

Y: The predicted probability of the male capture

X1: Male age

X2: Attractant (1 = CAR; 0 = ME)

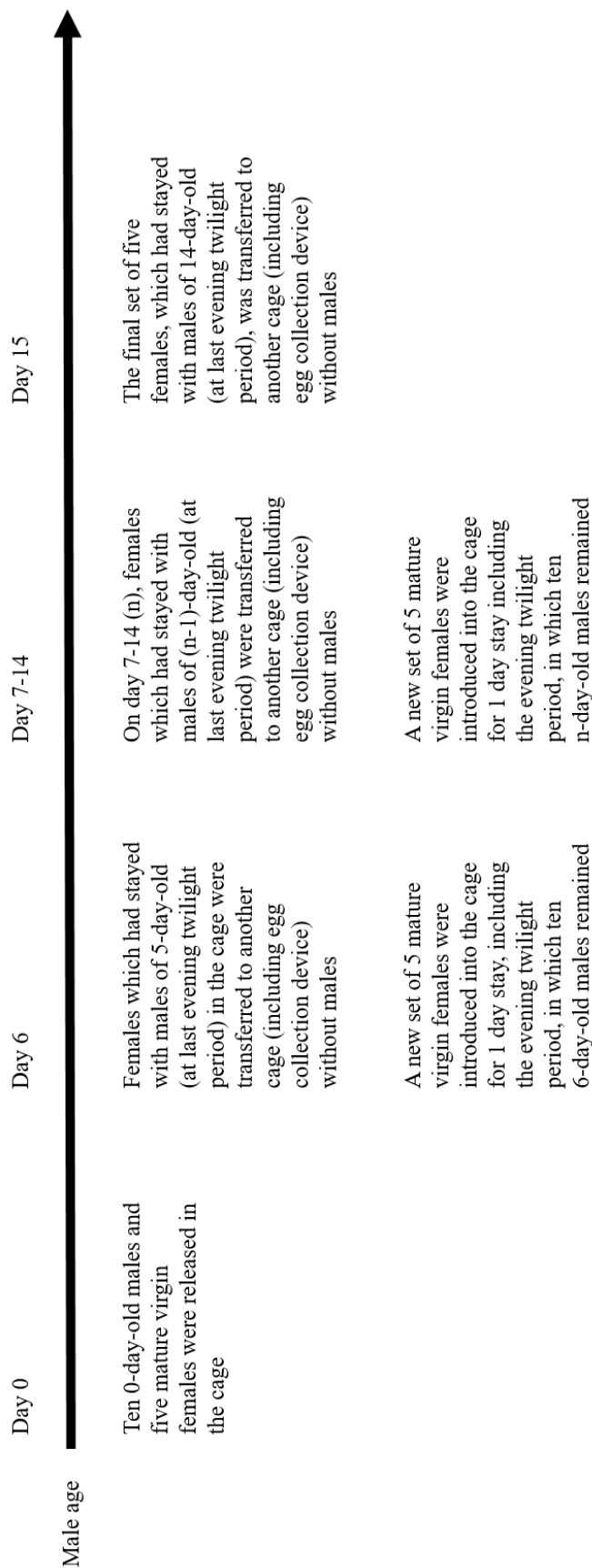


Fig. 4.1 The figure on *Bactrocera correcta* male sexual maturation test to facilitate understanding. All tests were conducted in the morning. The eggs were collected to observe hatching from the egg collection devices

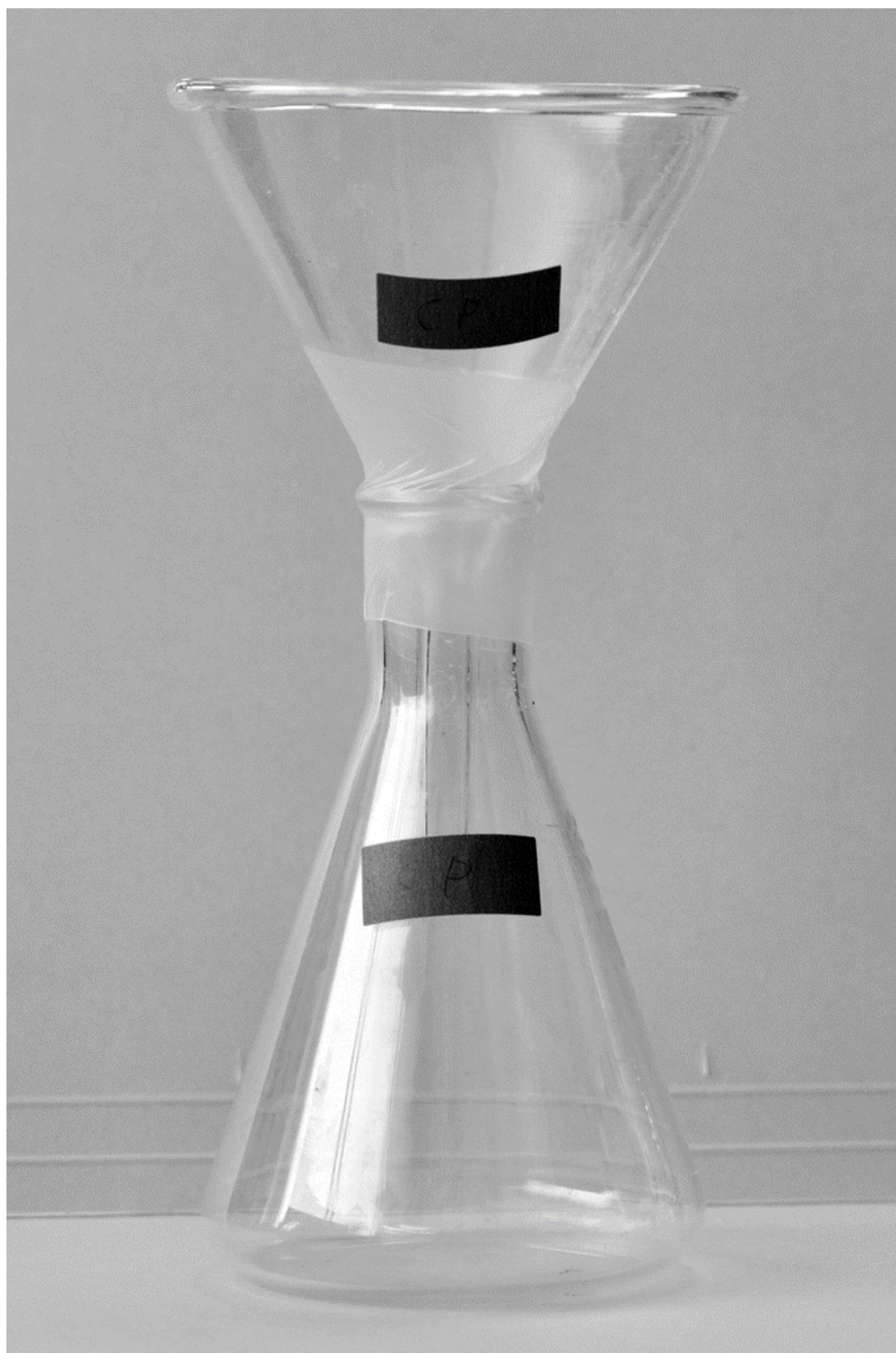


Fig. 4.2 A simple trap devised to conduct bioassays of the male response of *B. correcta* to β -caryophyllene (CAR) or methyl eugenol (ME)

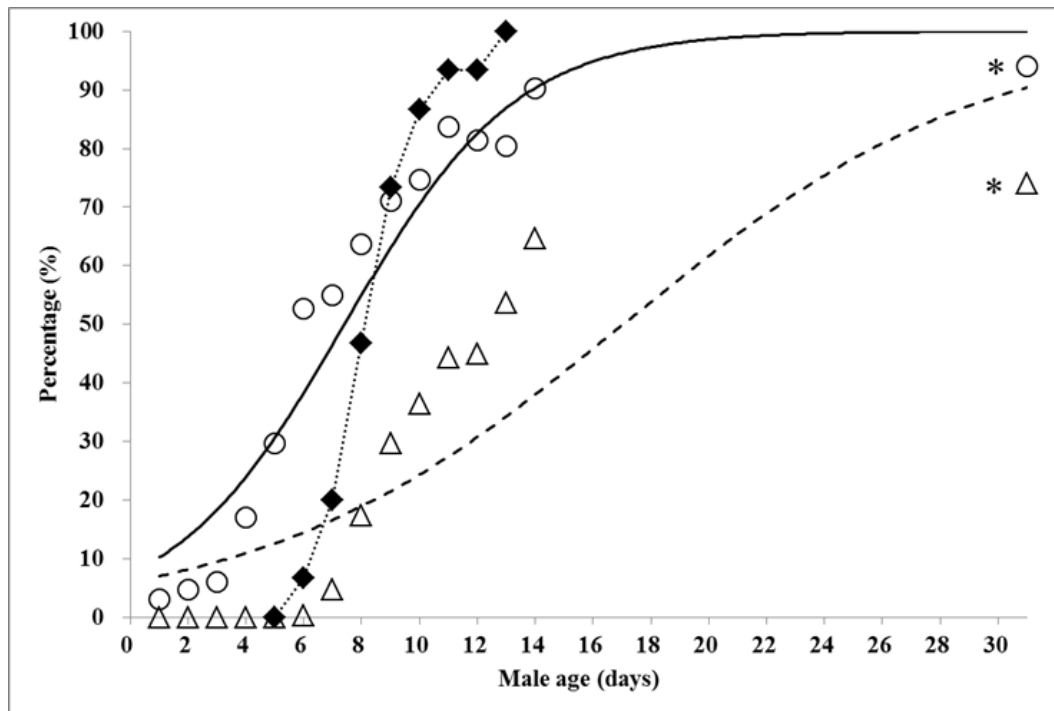


Fig. 4.3 Daily sexual maturation rates (filled diamonds connected with a dotted line) of *B. correcta* males and the mean capture rates in the simple traps baited with CAR (open circles) or ME (open triangles). The prediction curves of the response probability for CAR and ME are solid and break lines, respectively. The asterisk (*) represents the actual mean capture rate at over 30-day-old

第5章 誘引剤使用トラップによる雄捕獲がセグロモミバエの交尾抑制

に及ぼす効果

5.1 緒言

第3章で示したとおり、セグロモミバエが我が国に侵入した場合、かつて我が国に定着していたミカンコミバエおよびウリミバエと同様、セグロモミバエは我が国に定着する可能性が高い。我が国に本種が侵入定着した場合、果実生産に被害が生じるだけでなく国内外への果実流通規制等の植物検疫措置が実施されるかもしれない。このため、本種が我が国に侵入定着した場合の根絶防除実施のため、本種の迅速かつ有効な根絶防除技術の確立が望まれる。さて、比較的安価で簡便な根絶防除技術である雄除去法での根絶成功の要件は、性成熟前の雄が誘引剤に反応することである。そこで、性成熟前の本種雄における CAR または ME への反応を調査するため、第4章で示した試験を行った結果、CAR に性成熟前の本種雄が一定数反応した一方、ME には全く反応しなかった。これを考慮した上で本種の雄除去法における CAR の有効性をさらに明らかにするため、実験室内の試験で CAR または ME 使用簡易トラップでの雄捕獲による本種の交尾抑制効果を、産卵された卵の受精状況を調査することによって比較した。

5.2 材料および方法

5.2.1 供試虫

第3章および第4章で示したベトナム産セグロモミバエを供試した。本研究を行った際、ベトナムで6年以上、日本で6年以上の累代飼育期間、つまり、

ベトナムでの採集後，12 年以上が経過しており，日本における累代飼育世代数は 40 世代以上であった。

5.2.2 CAR または ME 使用簡易トラップでの雄捕獲による交尾抑制効果

実験室内ケージにおいて CAR または ME 使用簡易トラップでの雄捕獲による交尾抑制効果を調べるための試験を行った。はじめに，雄の羽化日である 0 日目（雄 0 日齢）の午前中，成虫の人工飼料および水寒天を置いた大型スクリーンケージに羽化直後（0 日齢）のセグロモモミバエ雄 50 頭および羽化後日齢が 30 日齢を超えた未交尾成熟雌 50 頭を放飼した。なお，雌における性成熟の影響を取り除くために成熟雌を供試した。第二に，人工気象装置に本ケージを設置した。人工気象装置は一定条件（温度： $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，相対湿度： $60 \pm 10\%$ ，光周期：明期 14 時間および暗期 10 時間，薄明薄暮期：明期の最初と最後の 1 時間）で維持された。第三に，1 日目（雄 1 日齢）の午前 10:00 から 11:00 までの間，本ケージに，CAR または ME 使用簡易トラップ，コントロールとしての CAR または ME 未使用簡易トラップおよび小型採卵容器を設置した。試験期間中，同一の人工気象装置内に CAR 使用簡易トラップ設置ケージと ME 使用簡易トラップ設置ケージを一緒に置かないようにした。第四に，2 日目（雄 2 日齢）から 28 日目（雄 28 日齢）までの午前 10:00 から 11:00 までの間，小型採卵容器から卵を回収した。シャーレ内に水で湿らせた濾紙を置き，その上に敷いたガーゼに回収した卵を置きシャーレに蓋をした後，人工気象装置内で 3 日間維持した。その後，卵の受精状況を確認するため孵化の有無を確認した。第五に，2 日目（雄 2 日齢）から 28 日目（雄 28 日齢）までの午前 10:00 から 11:00 までの間，簡易トラップで

捕獲された個体または簡易トラップで捕獲されずケージ内で自然死亡した個体を回収し、その性別および頭数を記録した。第六に、2日目（雄2日齢）から28日目（雄28日齢）までの午前10:00から11:00までの間、コントロールトラップで捕獲された生存個体について、その性別および頭数を記録した後、それらをケージに戻した。また、コントロールトラップで捕獲されトラップ内で死亡した個体については、それらを回収し、その性別および頭数を記録した。第七に、試験の間、ハンドリングミスのような偶発的な原因で死亡した個体を回収し、その性別および頭数を記録した。なお、偶発的な原因で死亡した個体の中で死亡日（雄の日齢）が不明なものもあった。第八に、28日目（雄28日齢）の試験終了時、ケージ内で生存していた個体を回収し、その性別および頭数を記録した。第九に、試験には、CARまたはME使用簡易トラップ設置ケージ10ケージを使用した。

試験終了時の28日目（雄28日齢）に生存していた雄または雌の残存率を「 $100 \times (\text{試験終了時の CAR または ME 使用簡易トラップ設置ケージ 10 ケージにおける残存した生存雄または雌の合計数}) / [500 (\text{CAR または ME 使用簡易トラップ設置ケージ 10 ケージに放飼した雄または雌の合計数}) - (\text{試験終了時の CAR または ME 使用簡易トラップ設置ケージ 10 ケージにおけるコントロールトラップおよび偶発的な原因で死亡した雄または雌の累計数})]$ 」として計算した。また、試験終了時の雄または雌の累計自然死亡率を「 $100 \times (\text{試験終了時の CAR または ME 使用簡易トラップ設置ケージ 10 ケージにおける自然死亡した雄または雌の累計数}) / [500 - (\text{試験終了時の CAR または ME 使用簡易トラップ設置ケージ 10 ケージにおけるコントロールトラップおよび偶発的な原因で$

死亡した雄または雌の累計数)]]」として計算した。

これらの方法の理解を助けるため Fig.5.1 に本試験の方法に係る概略図を示す。

5.2.3 データの解析

5.2.3.1 累積捕獲率データの解析

はじめに、CAR または ME 使用簡易トラップにおける雄または雌の累積捕獲率を示すため Kaplan-Meier curve を作成した。Mixed effects Cox regression model によって捕獲した雄日齢に関する雄捕獲トラップ使用誘引剤(CAR または ME)の影響を解析した。なお、ランダム効果として、この model にそれぞれの大型スクリーンケージにつけたケージ番号 (No. 1-No. 10) を入れた。次に、Generalized Wilcoxon test によって CAR 使用簡易トラップと ME 使用簡易トラップにおける雄累積捕獲率の差を解析した。ただし、雄が 28 日齢まで生存したとき、雄が自然死亡したとき、雄が偶発的な原因で死亡し死亡日が明らかであるとき、またはコントロールトラップ内で雄が死亡したとき、これらのデータを打ち切った。また、Kaplan-Meier method, Mixed effects Cox regression model および Generalized Wilcoxon test について、雄が偶発的な原因で死亡し死亡日が不明であったとき、これらのデータを使用しなかった。Kaplan-Meier curve の作成ならびに Mixed effects Cox regression model および Generalized Wilcoxon test による解析のため、統計ソフト R (R Core Team, 2019) を使用した。

5.2.3.2 受精卵が得られた CAR または ME 使用簡易トラップ設置ケージの

累積割合データの解析

はじめに、受精卵が得られた CAR または ME 使用簡易トラップ設置ケージの累積割合を示すため Kaplan-Meier curve を作成した。Cox regression model によって受精卵が最初に得られた雄日齢に関するトラップ使用誘引剤の影響を解析した。次に、Generalized Wilcoxon test によって受精卵が得られた CAR 使用簡易トラップ設置ケージと ME 使用簡易トラップ設置ケージの累積割合における差を解析した。ただし、受精卵が雄 28 日齢まで得られなかったとき、これらのデータを打ち切った。Kaplan-Meier curve の作成ならびに Cox regression model および Generalized Wilcoxon test による解析のため統計ソフト R (R Core Team, 2019) を使用した。

5.3 結果および考察

Fig. 5.2 に、Kaplan-Meier curve でセグロモモミバエ雄または成熟雌の CAR または ME 使用簡易トラップにおける累積捕獲率を示した。CAR 使用トラップにおいて雄 2 日齢で初めて雄が捕獲された。2 日齢で雄の累積捕獲率 (%) ($100 \times$ Fig. 5.2 の Cumulative probability) は 2.9%であった。そして、6 日齢, 9 日齢, 14 日齢および 28 日齢雄の累積捕獲率は、それぞれ、14.6%, 55.3%, 91.7%および 98.5%であった。次に、ME 使用トラップにおいて 4 日齢で初めて雄が捕獲された。4 日齢雄の累積捕獲率 (%) は 0.4%であった。そして、6 日齢, 9 日齢, 14 日齢および 28 日齢雄の累積捕獲率は、それぞれ、2.4%, 13.1%, 27.1%および 58.1%であった。また、Mixed effects Cox regression の結果は、CAR において、

[log hazard ratio = -2.9, hazard ratio = 0.06, se (coef) = 0.82, 95% confidence interval of hazard ratio = 0.01 to 0.28, $z = -3.51$, $p < 0.05$] で, ME において [log hazard ratio = 2.9, hazard ratio = 18.11, se (coef) = 0.82, 95% confidence interval of hazard ratio = 3.6 to 91.2, $z = 3.51$, $p < 0.05$] であり, 捕獲した雄日齢に関する雄捕獲トラップ使用誘引剤 (CAR または ME) の影響は有意であった。そして, Generalized Wilcoxon test の結果, CAR 使用トラップにおける雄の累積捕獲率は ME より有意に高かった ($p < 0.05$)。

CAR 使用トラップ設置ケージにおける試験終了時の雄 28 日齢時点で, 生存していた雄の残存率は 1.3%であり CAR 使用トラップ設置ケージの全 10 ケージ中 5 ケージにおいて生存雄は残存していなかった。一方, ME 使用トラップ設置ケージにおける 28 日齢時点で, 生存雄の残存率は 34.9%であり ME 使用トラップ設置ケージの全 10 ケージにおいて一定数の生存雄が残存していた。

CAR 使用トラップ設置ケージにおける雄 28 日齢時点での雌の累積捕獲率は 47.3%で, ME 使用トラップ設置ケージにおける雌の累積捕獲率は 41.8%であった (Fig. 5.2)。28 日齢での CAR 使用トラップ設置ケージにおける生存雌の残存率は 48.5%であり, ME 使用トラップ設置ケージにおける生存雌の残存率は 49.2%であった。そして, CAR または ME 使用トラップ設置ケージ全 10 ケージにおいて一定数の生存雌が残存していた。次に, 雄 28 日齢で CAR 使用トラップ設置ケージにおける雄および雌の累計自然死亡率は, それぞれ 2.5%および 4.7%であった。一方, ME 使用トラップ設置ケージにおける雄および雌の累計自然死亡率は, それぞれ 10.4%および 11.6%であった。CAR 使用トラップ設置ケージにおける, 日ごと, コントロールトラップごとの雄および雌の平均捕獲数は,

それぞれ 0.02 および 0.07 であった。一方、ME 使用トラップ設置ケージにおける、日ごと、コントロールトラップごとの雄および雌の平均捕獲数は、それぞれ 0.24 および 0.26 であった。

Mixed effects Cox regression の結果は有意で、CAR 使用トラップにおける雄の累積捕獲率は ME より有意に高く、雄 28 日齢での CAR 使用トラップ設置ケージにおける生存雄の残存率は ME より低かった。以上のことから、CAR は ME よりセグロモミバエ雄を強力に誘引する可能性が高い。2 日齢および 3 日齢雄は、CAR 使用トラップで捕獲されたが、ME 使用トラップでは全く捕獲されなかった。第 4 章で行った試験で、1 日齢から 5 日齢までの雄は CAR 使用トラップで捕獲された一方、ME 使用トラップでは全く捕獲されなかった。それゆえ、本章の結果は、第 4 章と類似している。

これまで、セグロモミバエ成熟雌において CAR と ME への反応を比較した研究は報告されていなかった。本研究の実験室内条件において雌は ME より多く CAR に反応し、雌の CAR または ME への反応は雄より弱いことが明らかになった。第 4 章に示したとおり CAR 単独のセグロモミバエに対する誘引性を ME と比較するため、2013 年、タイ国内で野外の 3 地点に CAR または ME 使用トラップが設置され本種の捕獲数が調査された。その結果、CAR または ME 使用トラップで雄のみが捕獲され雌は全く捕獲されなかった (Wee et al., 2018)。一方、梅谷ら (1973) は、野外ケージに放飼されたミカンコミバエ雌が、ケージ内の ME 使用トラップで捕獲されたことを報告した。以上によると、雌は野外に設置されたトラップで捕獲されなかった一方、ケージ内に設置されたトラップで捕獲されている。この理由としてケージ内の空間が制限されていることが挙

げられるが、正確な理由は不明である。

CAR 使用トラップ設置ケージにおける雄および雌の累計自然死亡率は ME より低く、CAR 使用トラップ設置ケージ内のコントロールトラップにおける捕獲数は ME より少なかった。雄 2 日齢以降、CAR 使用トラップ設置ケージでの個体の密度が ME より低かったことによって本結果が引き起こされたと推定される。

Fig. 5.3 に、Kaplan-Meier curve でセグロモモミバエの受精卵が得られた CAR または ME 使用トラップ設置ケージの累積割合を示した。雄 8 日齢以降、受精卵が得られた CAR 使用トラップ設置ケージの累積割合は ME より低かった。Cox regression の結果は、CAR において [log hazard ratio = -2.90, hazard ratio = 0.06, se (coef) = 0.82, 95% confidence interval of hazard ratio = 0.01 to 0.28, $z = -3.51$, $p < 0.05$] で、ME において、[log hazard ratio = 2.90, hazard ratio = 18.11, se (coef) = 0.82, 95% confidence interval of hazard ratio = 3.60 to 91.20, $z = 3.51$, $p < 0.05$] であり、受精卵が最初に得られた雄日齢に関するトラップ使用誘引剤の影響は有意であった。Generalized Wilcoxon test の結果、受精卵が得られた CAR 使用トラップ設置ケージの累積割合は ME より有意に低かった ($p < 0.05$)。試験期間全体を通して、受精卵は、ME 使用トラップ設置ケージ全 10 ケージで得られた一方、CAR 使用トラップ設置ケージ全 10 ケージ中 5 ケージで得られなかった。受精卵が初めて得られた日齢は、CAR および ME 使用トラップ設置ケージにおいて、それぞれ 12 日齢および 8 日齢であった。なお、CAR および ME 使用トラップにおける 8 日齢雄の累積捕獲率は、それぞれ 38.8% および 8.6% であった (Fig. 5.2)。そして、それぞれのケージで受精卵が初めて得られた雄日齢の全ケージ平均は、

CAR 使用トラップ設置ケージにおいて 15.2 日齢，ME において 9.5 日齢であった。

Cox regression の結果は有意で，受精卵が得られた CAR 使用トラップ設置ケージの累積割合は ME より低く，CAR 使用トラップ設置ケージで受精卵が初めて得られた雄の日齢は ME より遅かった。従って，これらの結果は，CAR 使用トラップによる雄捕獲が ME と比較して受精卵の産卵，つまり，交尾を強く抑制することを示す。また，受精卵が得られなかった 50% の CAR 使用トラップ設置ケージで，ほとんど全ての生存雄が性成熟前に捕獲されたと考えられる。第 4 章の試験で CAR に性成熟前の本種雄が一定数反応したが，ME には全く反応しなかった。それゆえ，本章の結果は第 4 章の結果と類似している。さらに，本章の研究は，CAR 使用トラップによる性成熟前の雄捕獲が受精卵の産卵，つまり，交尾を強く抑制したことを明らかにした。ところで，本研究では得られた受精卵数を記録しなかった。得られた受精卵数の記録は，CAR 使用トラップでの雄捕獲による交尾抑制効果を定量的に評価するため有効であると考えられる。今後，同様の研究を行う際には得られた受精卵数を記録することが望ましい。

本研究で，雄 1 日齢以降，閉鎖された人工気象装置内の大型スクリーンケージに CAR または ME 使用トラップを設置していた。すなわち，CAR または ME の香気に雄を常時暴露していた。Chambers et al. (1972) は，羽化後 4-5 日間，ウリミバエ不妊化雄をキュウルアの香気に暴露した。その後，キュウルア使用トラップに対する香気に暴露した不妊化雄の反応を調査した。その結果，香気に暴露した不妊化雄の反応は香気に暴露せず不妊化もしていないウリミバエ雄の 12.2-38.5% になったことを報告した。本結果は，キュウルア香気にウリミバエ雄を暴

露することによってキュウルアに対する雄の反応が弱まったことを示唆する。

この報告を考慮すると、CAR または ME の香気にセグロモミバエ雄を暴露することによって CAR または ME に対する本種雄の反応が弱まることも考えられる。従って、本研究で、常時 CAR または ME に暴露されていた雄の誘引剤に対する反応は、暴露されていない雄と比較して弱まっていた可能性がある。また、Orankanok et al. (2013) は、タイ産セグロモミバエを供試して以下の試験を行った。まず、成熟した ME 未摂食の不妊化していない野生系統雄 50 頭と未交尾雌 50 頭をケージに放飼した。次に、各日齢の ME を摂食させた不妊化雄 50 頭または ME 未摂食の不妊化雄 50 頭を放飼後、交尾に成功した雄の数を観察し記録した。そして、これらの数に基づき相対的な不妊化雄における交尾能力の指標である Relative Sterile Index (RSI) [$RSI = \frac{\text{交尾に成功した不妊化雄の数}}{\text{交尾に成功した不妊化雄の数} + \text{交尾に成功した不妊化していない野生系統雄の数}}$] を算出した。その結果、ほとんどの日齢で ME 摂食不妊化雄の RSI が ME 未摂食不妊化雄より有意に高く、雄 7 日齢以降の多くの日齢で ME 摂食不妊化雄が 0.5 を超えたが、ME 未摂食不妊化雄は 0.5 を超えなかった。言い換えれば、ME 摂食不妊化雄の交尾成功率は ME 未摂食不妊化雄より有意に高く、成熟した ME 摂食不妊化雄は成熟した ME 未摂食野生系統雄に匹敵した。また、Wee et al. (2018) は、タイ産本種を供試して、CAR 摂食野生系統雄の交尾成功率を、誘引物質未摂食の野生系統雄および ME 摂食野生系統雄と比較した。その結果、CAR 摂食雄の交尾成功率は、誘引物質未摂食雄より有意に高く、ME 摂食雄と有意な差はなかったことを報告した。これらの報告を考慮すると、CAR または ME の香気に本種雄を暴露することによって交尾成功率が上昇する可能性も考えられる。

従って、本研究で、常時 CAR または ME に暴露されていた雄の交尾成功率は、暴露されていない雄と比較して上昇していた可能性がある。さて、誘引剤暴露の影響を取り除いた上での、誘引剤に対する雄の反応を調べるためには、後述の野外ケージを使用した試験の実施が有効である。

これまで、CAR または ME 使用トラップでの雄捕獲によるセグロモミバエの交尾抑制効果に関する研究は報告されていなかった。実験室条件下で行った本研究は、CAR 使用トラップでの雄捕獲が ME と比較して交尾を強く抑制することを明らかにした。本結果から、雄除去法に寄与する本種雄の誘引剤として CAR は ME より有効であると考えられる。これまで閉鎖環境ではない野外ケージを使用した本研究と同様の研究は行われていない。そこで、Shelly et al. (2008) および梅谷ら (1973) が示した野外ケージと同様のものを使用して、本研究と同様の試験を行い、CAR 使用トラップでの雄捕獲（雄除去）による交尾抑制効果を調査することも望まれる。

Kaneda et al. (2018) は、ポンプ組織として挿入器先端に精子を送り出していると考えられるセグロモミバエ雄の ejaculatory apodeme（射精甲）(Fig 5.4) が、齢の進行に伴い発達するため、性成熟発達の指標となることを報告した。また、野外のモニタリングトラップで捕獲された本種野生雄における射精甲の発達程度を調査することで、その性成熟の程度が特定できる可能性も示した。今後、本種発生国に設置した CAR 使用モニタリングトラップで捕獲された本種雄の射精甲を調査することにより、どれだけの割合の未成熟雄が捕獲されるかを明らかにすることも望まれる。

また、これまで我が国は、本種に対する侵入警戒調査用モニタリングトラッ

ブ誘引剤として ME を使用している。今般、本研究は、CAR が ME より本種のモニタリングおよび雄除去法に有効な誘引剤である可能性が高いことを示したが、CAR 使用トラップを従来の ME 使用トラップと別に設置することはコスト面で非効率である。このため、従来の ME 使用トラップが CAR と ME を混合した混合誘引剤を使用するトラップで代替できることが望ましい。ME とキュウルアを同一トラップ内に設置してトラップ調査を実施したところ、その捕獲効率が低下した事例が報告された (Royer and Mayer, 2018)。そのため、複数の誘引剤を混合することが誘引効果に負の影響を与える可能性も捨て切れない。そこで、農林水産大臣許可の下、植物防疫所で累代飼育しているセグロモモミバエ雄またはミカンコミバエ雄を供試して、室内ケージにおける CAR と ME の混合誘引剤を使用したトラップでの捕獲数を、セグロモモミバエについては CAR 単独使用トラップでの捕獲数と、ミカンコミバエについては ME 単独使用トラップでの捕獲数と、それぞれ比較した。その結果、セグロモモミバエ雄の混合誘引剤における捕獲数は CAR 単独よりやや多かったことおよびミカンコミバエ雄の混合誘引剤における捕獲数は ME 単独と差がなかったことが明らかになった (金田・佐々木, 未発表)。今後、両種の分布国で本混合誘引剤を使用した野外のモニタリングトラップ調査を行う必要がある。

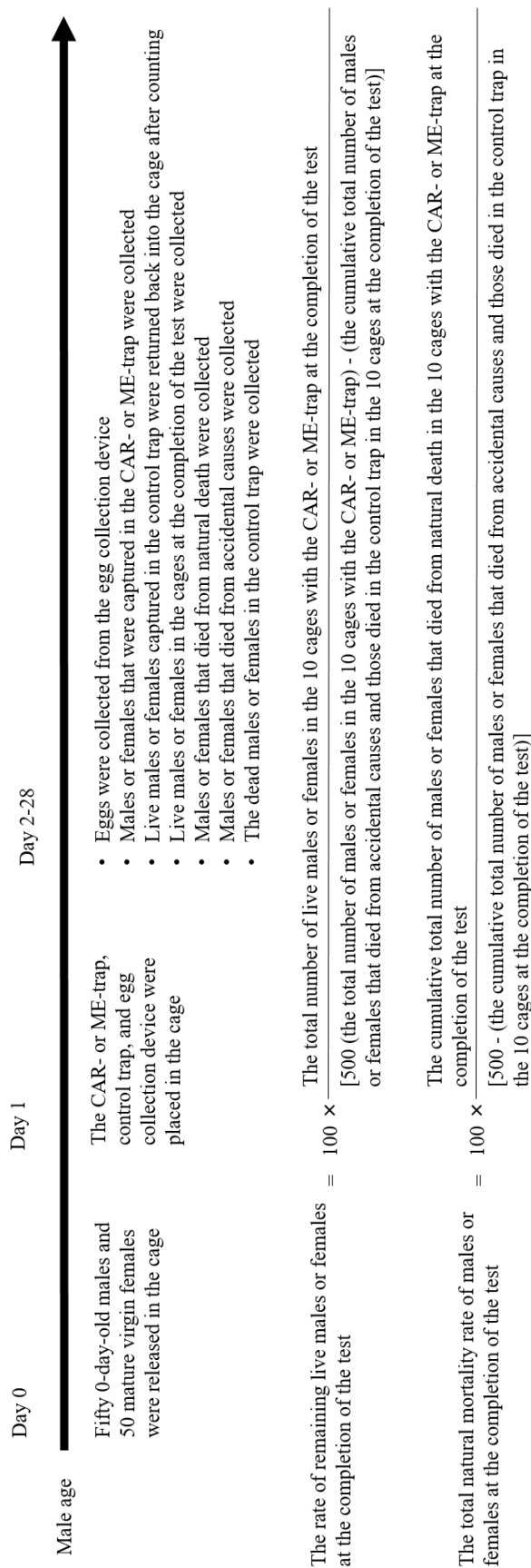


Fig. 5.1 The figure on the test for suppressive effects of *Bactrocera correcta* male capture in the traps baited with β -caryophyllene (CAR) or methyl eugenol (ME) on mating to facilitate understanding. All tests were conducted in the morning. The eggs were collected to observe hatching from the egg collection devices

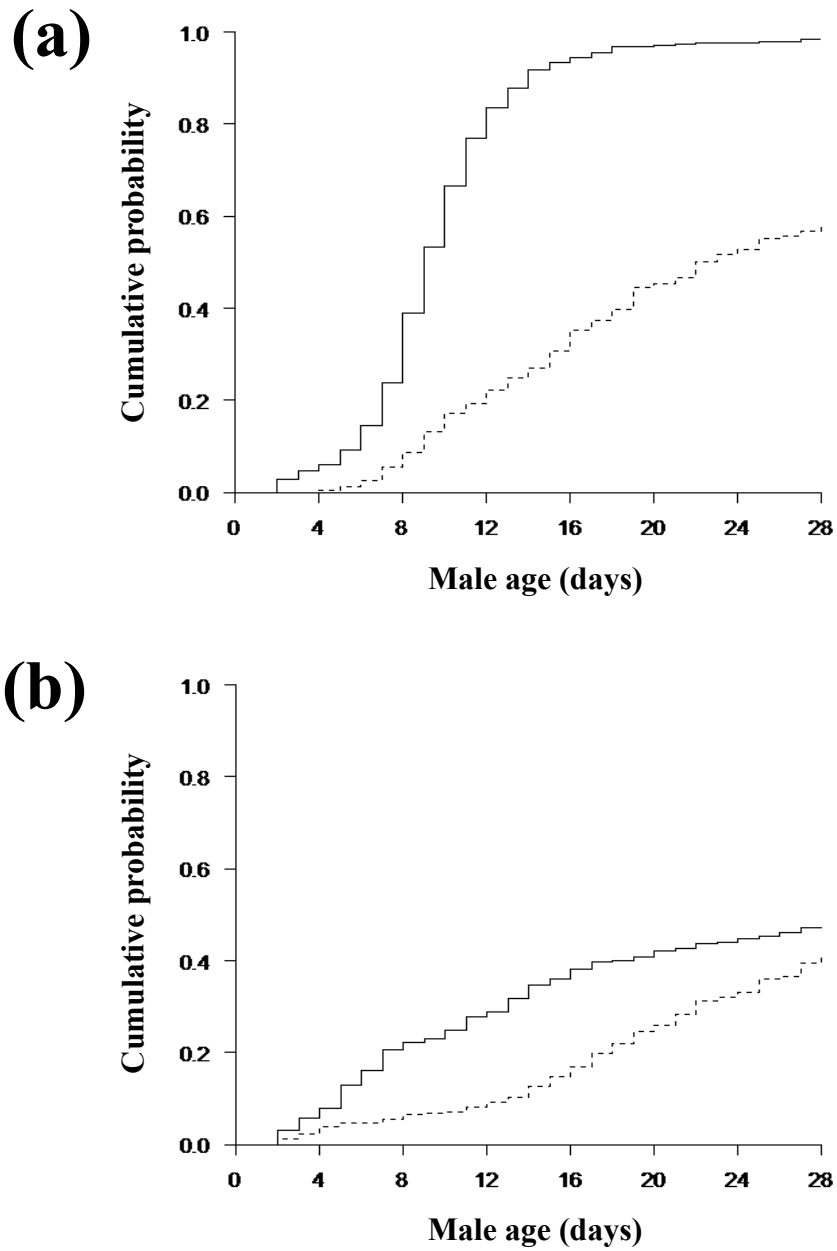


Fig. 5.2 Kaplan-Meier curves showing the daily cumulative capture probability in the traps baited with CAR (solid line) or ME (broken line) of *B. correcta* males (a) and mature females (b)

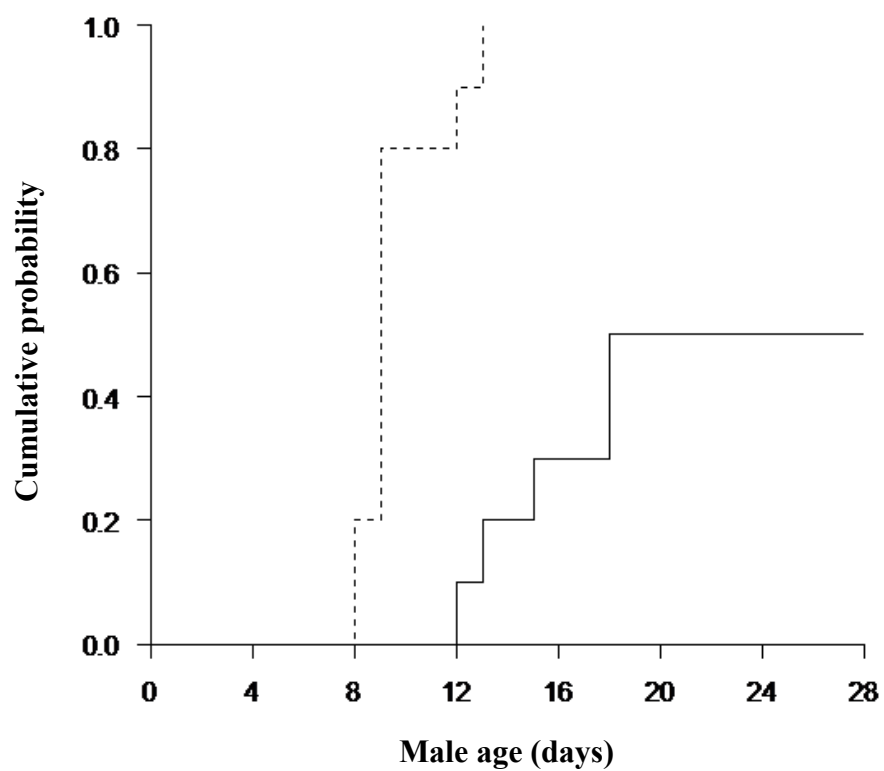


Fig. 5.3 Kaplan-Meier curves showing the daily cumulative probability of the cages in which fertilized eggs of *B. correcta* were obtained with the CAR-baited trap (solid line) or ME-baited trap (broken line)

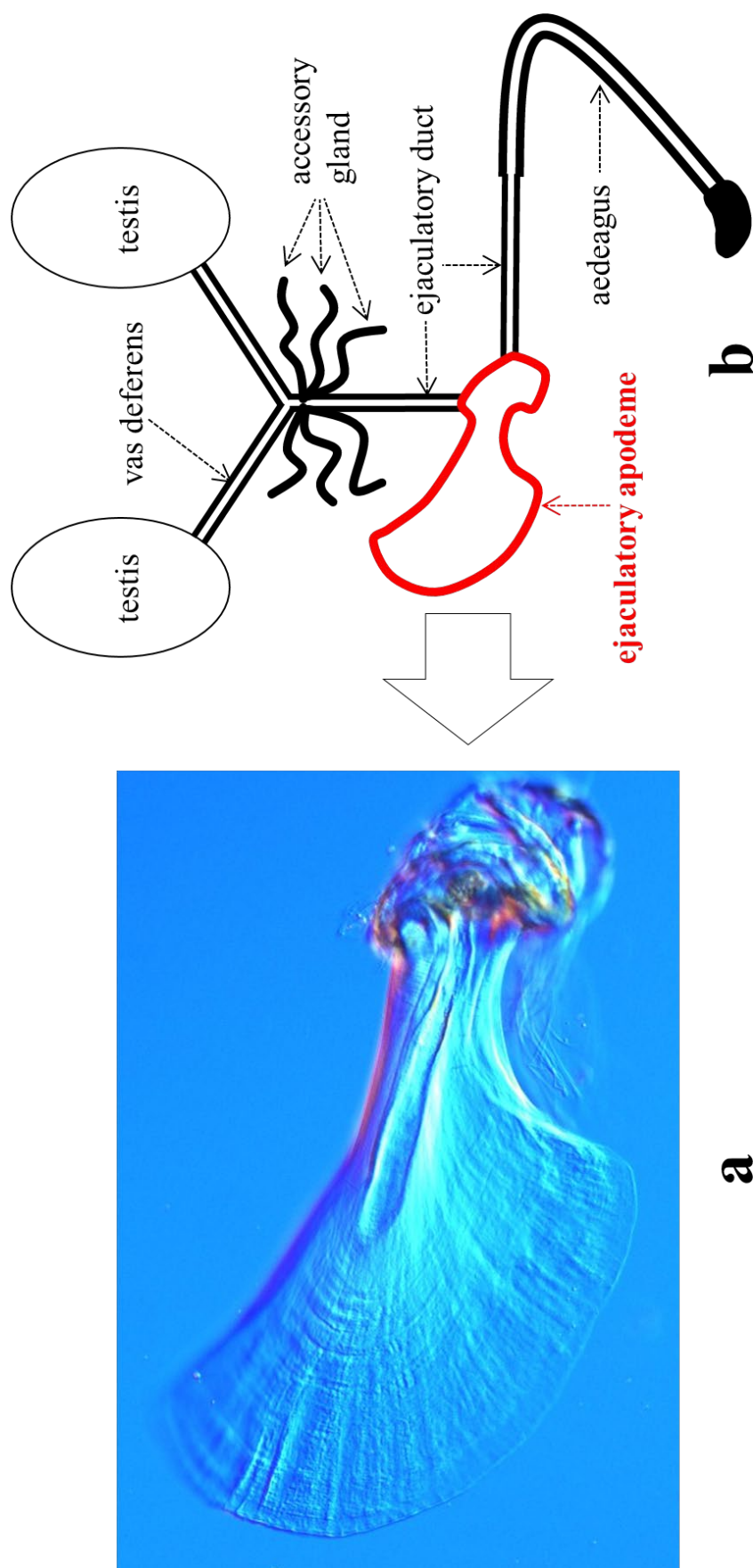


Fig. 5.4 An ejaculatory apodeme of a *B. correcta* male (9-day-old) (a), and the location of the ejaculatory apodeme in the pattern diagram of the male reproductive organ for fruit flies (Tephritidae) (b)

第6章 総合考察

重要ミバエが我が国に侵入するリスクは急速に高まっていると考えられる。これらが我が国に侵入定着を果たした場合、国内生産への甚大な被害はもちろんのこと、日本産農産物の他国向け輸出にも大きな影響がある。今後、我が国における少子高齢化社会の到来により日本国内のマーケットは縮小する見込みであるが、海外には今後伸びていくと考えられる有望なマーケットが存在している。このため、国を挙げて果実等を含む農林水産物の輸出促進が推し進められているところである（農林水産省, 2014）。しかし、第1章で示したとおり、我が国に重要ミバエが侵入定着した場合、他国政府によって日本産果実の輸入禁止措置が講じられることにより輸出促進の深刻な阻害要因となると予想される。従って、重要ミバエにおける確実・迅速な侵入定着防止対策の強化は必要不可欠である。これらの理由から、侵入が警戒されるミバエの効果的・効率的な侵入定着防止技術を確立することの重要性はますます高まっている。これらの技術の確立を目的に本研究は実施され、ミバエ殺虫処理卵の生死判定における ATP 量分析の有用性、セグロモモミバエの発育零点・有効積算温度および侵入定着リスクが高い地域、そして、侵入警戒調査および根絶防除に有効と考えられる本種の誘引剤を明らかにした。本研究の有効性が挙証された場合、効果的・効率的な侵入定着防止技術として、検疫で発見されるミバエ卵の確実・迅速な生死判定、セグロモモミバエの侵入定着リスクが高い地域におけるモニタリングトラップ調査の強化および実効性のある根絶防除計画策定ならびに本種侵入時の早期発見および迅速な根絶防除技術の確立に役立つと考えられる。な

お、以下に各章の要約を簡単に示す。

第 2 章では、検疫で発見されるミバエ殺虫処理卵の生死判定時間短縮を目的にミカンコミバエの無処理卵または完全殺虫処理卵を供試し短時間で実施可能な ATP 量分析を行い検疫における本分析の適用可能性を考察した。その結果、低温処理卵への適用は困難であると推定された一方、温湯浸漬処理卵または蒸熱処理卵への適用可能性が示された。

第 3 章では、ベトナム産セグロモモミバエを供試して $T_0 \cdot K$ を推定し、これらに基づき日本各地での発育・生殖可能月および年間発生世代数を推定した。推定した発育・生殖可能月によると奄美・那覇で発育・生殖が周年可能であり、同地域での年間発生世代数は重要害虫のミカンコミバエ等と近似していた。

第 4 章では、セグロモモミバエの雄性成熟日齢および CAR または ME 使用トラップにおける各日齢の雄捕獲率を調査した。その結果、CAR は交尾前の雄を捕獲したが ME は捕獲しなかったことに基づき、雄除去法のための誘引剤として CAR は ME より有効である可能性を示した。また、本種のモニタリングトラップ誘引剤として CAR は ME より有効と考えられた。

第 5 章では、CAR および ME 使用トラップにおけるセグロモモミバエの雄捕獲による交尾抑制効果を比較した。その結果、CAR は ME より、交尾を強く抑制し、雄除去法に有効と推定された。

さて、ここからは、重要ミバエの効果的・効率的な侵入定着防止に役立つと考えられる報告を示しながら、将来における実用化または研究の方向性について述べる。なお、Fig. 6.1 に、将来の実用化または研究が望まれること、これらに関連する措置および重要ミバエの侵入経路、について概略を示す。

ミバエの光応答反応に関する研究は、迅速な検疫および侵入リスクの低減に役立つかもしれない。第2章で示したとおり、重要ミバエの完全殺虫処理が確立された場合、濃密防除が行われている輸出国の生産地で生産され殺虫処理された果実について、関係法令改正等の手続きを経て我が国は輸入を解禁する。濃密防除地区で生産された果実でもミバエ卵は時折発見される。果実が産卵されていた場合、適切に殺虫処理されていれば卵は孵化できないため侵入リスクはないが卵の生死判定で検疫に余分な時間を要し迅速な物流を妨げる。また、何らかの原因で殺虫処理の失敗等が生じ、さらに、検疫で卵が発見できなかった場合、ミバエが我が国に侵入するおそれもある。以上のことから可能な限り産卵を阻止することが重要である。生産地で果実がミバエに産卵されないためには有効な濃密防除が必須である。近年、我が国では昆虫の光応答反応を利用した防除の研究が進展している。本反応を利用した防除の例として、昆虫の波長選好性を利用したライトトラップ・粘着シートによる害虫捕獲および天敵昆虫の誘引による害虫の発生抑制ならびに、昆虫の忌避反応を利用した害虫が忌避する波長の光源を設置することによる栽培施設への侵入防止等が挙げられる（荻野ら, 2018; 霜田, 2018）。そこで、重要ミバエにおける光応答反応研究の実施も望まれる。将来、重要ミバエで、これらの防除技術が確立した場合、輸出国における濃密防除法策定の一助となり産卵された果実の輸入が減少する可能性がある。

電子画像を使用して輸入果実の中からミバエに産卵された果実を検出する技術の開発は确实・迅速な検疫に役立つと考えられる。現在、農業者等による病害虫の識別に供するため、人工知能を活用した識別技術の開発を目的としたプ

プロジェクトが進められている。これらは生産現場で撮影された電子画像を使用して病害虫が識別できるアプリの開発を目標としている（岩崎, 2019）。将来、ここから得られた技術を応用して、検疫におけるミバエ産卵果実の検出に役立つアプリを開発することは有益である。

外部形態での種識別が困難な重要ミバエ卵における確実・迅速な種識別法の開発も重要である。ミバエの外部形態による種識別には、通常、成虫が必要であるが、検疫で発見されるステージは卵であることが多い。Huang et al.

（2009）は、確実かつ迅速な遺伝子の抽出法であるキレックス法および DNA 増幅法である Loop-Mediated Isothermal Amplification（LAMP）法によって、チチュウカイミバエ卵、幼虫および蛹の DNA を増幅し、本種を他種のミバエから識別する技術を開発した。この技術を発展させてミバエ卵の識別法を確立することは有益である。また、本識別法の確立は、モニタリングのための果実調査等でミバエ幼虫が発見された場合の識別にも役立つ。

重要ミバエ雌の誘引剤開発は効果的・効率的なモニタリングおよび防除に役立つかもしれない。Zhang et al.（2019）は、中国産セグロモモミバエを供試した室内試験で短期累代飼育雌（13 日齢）の直腸腺から得られた抽出物が未交尾の 15-16 日齢雌および雄を誘引したことを報告した。このことから、本種雌の直腸腺抽出物の成分は本種雌の誘引物質であると推定される。そこで、これらの成分が誘引剤として本種のモニタリング・防除に適用できるか否かを明らかにするため、抽出物各成分のさらなる誘引性調査が望まれる。

遠隔地に設置したトラップで捕獲されたミバエの自動計数ができるモニタリング技術の開発は効率的な侵入定着防止のために有用である。我が国における

ミバエのモニタリングトラップ調査は手作業で行われており、実際にミバエがトラップで捕獲されるタイミングとトラップ調査で確認されるタイミングにタイムラグが生じている。さらに、トラップ設置地点までの移動、ミバエの回収、個体数の計数等に多大な時間・労力も要している。近年、重要ミバエ発生国において遠隔地で捕獲されたミバエがリアルタイムで自動計数できるリモートセンシング技術を利用したトラップ開発が進められている (Jiang et al., 2013)。我が国でも同様の情報通信技術を利用したトラップ開発を検討することが望ましい。

ミバエの不妊虫放飼法改良を検討することは効果的な根絶防除法確立に極めて重要である。不妊虫放飼法は雄除去法での根絶が困難なミバエのみならず、本研究で示したミカンコミバエやセグロモモミバエのような雄除去法での根絶が可能と考えられる種に対して有効な場合もある。その一例として、かつて南西諸島に発生していたミカンコミバエの ME を使用した雄除去法による根絶は成功したが、小笠原諸島に発生していた本種の雄除去法による根絶は失敗し、その後、不妊虫放飼法によって小笠原諸島の本種が根絶されたことが挙げられる (吉澤, 1993; Yoshizawa, 1997)。この失敗の原因として ME 弱反応個体群の存在が指摘されているが (岩橋, 1998)、その詳細は明らかでない。

不妊虫放飼法における成功要件の一つは不妊化雄の交尾成功率が高いことであるが、不妊化雄の大量飼育工程は交尾能力を低下させる可能性がある。一方、誘引物質の摂食でミバエの交尾成功率が上昇し効果的な不妊虫放飼法に寄与するかもしれない。第 5 章で一部を示した Orankanok et al. (2013) は、交尾成功率が高い ME 摂食不妊化雄を放飼することでセグロモモミバエに対する不妊虫放飼法の有効性が高まる可能性を示唆した。また、セグロモモミバエほど顕著では

ないが、ミカンコミバエの ME 摂食不妊化雄を放飼することでも、その有効性が高まる可能性を併せて示した。同様に第 5 章で示した Wee et al. (2018) は、セグロモミバエの CAR 摂食雄も、ME 同様、交尾成功率が高いため不妊虫放飼法に役立つ可能性を示した。しかし、本報告では不妊化していない雄を供試したため、不妊化雄を供試した同様の試験を実施する必要がある。

誘引剤の香気に雄を暴露することはミバエ雄に誘引剤を摂食させることより簡便であると考えられる。そして、雄を誘引剤の香気に暴露することで交尾成功率が上昇するかもしれない。Haq et al. (2018) は、ME の香気に暴露したミカンコミバエ雄の交尾成功率上昇を報告した。そこで、誘引剤の香気に暴露した重要ミバエ雄における交尾成功率上昇の有無が調査されることも期待される。

不妊化雄に野生雄と同等の交尾競争能力を長期間維持させることは、不妊虫放飼法改良のため重要である。通常、不妊化していない雄と比較して、放射線照射された不妊化雄は虫質劣化のため交尾競争能力の維持期間が短い。ところで、通常、高線量による一回のみの放射線照射（一回照射）と比較して低線量による複数回の照射（分割照射）では虫質劣化が抑えられる、とされている。これらを考慮して、Kumano et al. (2011) は、イモゾウムシ *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire) を供試して分割照射雄の交尾能力維持期間を一回照射雄と比較した。その結果、分割照射雄の交尾能力維持期間は一回照射雄の少なくとも 2 倍であることが明らかになった。今後、重要ミバエでも分割照射雄と一回照射雄の交尾能力維持期間を比較することは有益である。

持続可能で安全なミバエの不妊虫放飼法確立が望まれている。これまでの不妊虫放飼法では不妊化のため放射性同位元素（コバルト 60）が使用されてきた。

本元素には半減期があるため定期的な更新の必要があり，更新のための線源は海外からの輸入に頼らざるを得ない。しかし，安全保障上の問題（テロ行為等）から本元素の輸送が困難になりつつある。現在，医療用ではない X 線照射装置（RS2400, Rad Source Technologies, USA）が市販されている。本装置のような X 線照射装置は放射性同位元素を利用しないため輸送が容易で安全である（熊野，2015）。上記を考慮してチチュウカイミバエおよびミナミアメリカミバエ *Anastrepha fraterculus*（Wiedemann）を供試し，X 線照射装置と放射性同位元素で不妊化した供試虫の，羽化率，飛翔の可否，交尾成功率等の虫質が比較された結果，その虫質に差がないことが明らかになった（Mastrangelo et al., 2010）。今後，X 線照射装置で不妊化したその他重要ミバエの虫質も調査されるべきである。

雄除去法と不妊虫放飼法を同時に行うと不妊化雄がトラップに捕獲され防除の有効性・効率性が低下する。一方，誘引剤弱反応性の不妊化雄を使用して不妊虫放飼法と雄除去法を同時に行えば，有効性・効率性が大幅に向上するため，これらの不妊化雄生産は重要である。第 5 章でも示したとおり Chambers et al. (1972) は，キュウルア香気に暴露したウリミバエ不妊化雄のトラップに対する反応が未暴露で不妊化していない雄より弱まったことを報告した。そこで，誘引剤弱反応性の不妊化雄生産のため誘引剤香気に暴露した重要ミバエ雄の誘引剤に対する反応を調査することも重要である。

近年，南西諸島のモニタリングトラップにおけるミカンコミバエ誘殺数が増加している。この増加は近隣分布国からの直接飛来に起因すると推定されている（大塚・松村，2018）。近い将来，地球温暖化および国際物流の増大による近隣諸国における重要ミバエの新たな発生または分布拡大のため，ミカンコミバエ

と同様、様々な重要ミバエが我が国に直接飛来する可能性がある。なお、ミバエと同列に論ずることはできないが、近年、近隣諸国での分布拡大後、我が国に侵入を果たしたミバエ以外の重要害虫にツマジロクサヨトウ *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) がある。本種は 2019 年 1 月に中国雲南省で初めて発生が確認された後、わずか 5 か月足らずの間に中国国内の合計 16 省に分布拡大し（松村ら, 2019), 2019 年 7 月に我が国でも発生が確認された（農林水産省, 2019)。さらに、近年の輸入量および国際線旅客数の増大で重要ミバエの侵入リスクが高まっているおそれもある。その一方、生鮮植物の輸入増加および物流迅速化に伴い一層の検疫手続き迅速化が求められている。このため、早急に我が国が侵入を警戒しているミバエの効果的・効率的な侵入定着防止技術に係る研究をさらに発展させ確立していかなければならない。



Fig. 6.1 What should be put to practical use or be studied for the effective and efficient techniques to prevent the invasion and establishment of economically important fruit flies in the future, the related measures, and the invasion pathways

概要

我が国が侵入を警戒しているミバエの効果的・効率的な侵入定着防止技術の確立を目的に研究を行った。第一に、ミバエの効果的・効率的な侵入防止技術確立のため、植物検疫で殺虫処理された果実から発見されるミバエ卵の生死判定に長時間を要している現状を踏まえ、迅速な判定方法が必要であった。そこで、生死判定時間を短縮する分析方法検討のため、重要害虫であるミカンコミバエの無処理卵または完全殺虫処理（低温処理、温湯浸漬処理をシミュレートした急速加熱処理、または蒸熱処理をシミュレートした低速加熱処理）卵を供試して、短時間で実施可能な ATP 量分析を行い、検疫における本分析の適用可能性を検討した。なお、本分析の適用要件は完全殺虫処理卵の ATP 量が無処理卵より少ないことである。分析の結果、多数の低温処理卵の ATP 量は無処理卵より多く、低温処理卵への本分析の適用は困難であると推定された。しかし、急速加熱処理卵の ATP 量は無処理卵より有意に少なく、温湯浸漬処理卵に本分析を適用できる可能性が示された。そして、低速加熱処理卵の ATP 量は、無処理卵より有意に少なかったが、急速加熱処理卵の ATP 量ほど少くはなかった。蒸熱処理後、長時間経過後であれば、さらなる減少が予想されるため、本分析適用の可能性は残されていると考えられる。今後、温湯浸漬処理卵または蒸熱処理卵における生死判定のための本分析方法適用に向けた検証試験として、輸出国に分布するミバエに産卵された果実を温湯浸漬処理または蒸熱処理後、長時間経過後に処理卵の本分析を実施することが今後の課題である。

第二に、重要害虫であるベトナム産セグロモモミバエを供試して、本種の効

果的・効率的な侵入定着防止技術，すなわち，侵入警戒調査・根絶防除法の確立に必要なパラメータである発育零点 (T_0) および有効積算温度 (K) を推定し，本パラメータに基づき日本各地における本種の発育・生殖可能月および年間発生世代数を推定した。その結果，卵期間，幼虫期間，蛹期間，産卵前期間および一世代期間で， T_0 (°C) は，それぞれ，12.96，12.17，12.3，14.19 および 12.91 であり， K (日度) は，それぞれ，18.43，72.6，141.88，175.7 および 418.97 であった。また，奄美・那覇での発育・生殖可能月は1月から12月まで，すなわち，発育・生殖は周年可能と推定された。そして，奄美および那覇の年間発生世代数は，それぞれ 7.66 および 8.85 で，重要害虫のミカンコミバエおよびウリミバエと近似していた。今後，推定した T_0 および K に基づき本種の世代期間を推定し，本世代期間を根拠とした本種の効果的な定着防止措置としての根絶防除計画の策定が望まれる。また，発育・生殖可能月および年間発生世代数を踏まえ，本種侵入時の早期発見のため，南西諸島でのモニタリングトラップ調査の強化が必要と考えられる。

第三に，セグロモミバエの効果的・効率的な侵入定着防止技術，すなわち，根絶防除のための雄除去法および侵入警戒調査用のモニタリングトラップ調査に有効な誘引剤の開発を検討した。本種雄の性成熟日齢および β -カリオフィレン (CAR) またはメチルオイゲノール (ME) 使用トラップにおける各日齢の雄捕獲率を調査した結果，CAR は交尾前の雄を捕獲したが，ME は捕獲できなかった。この結果から，雄除去法のための誘引剤として CAR は ME より有効であることが示唆され，本種のモニタリングトラップ誘引剤として CAR が有効と考えられた。

第四に、CAR によるセグロモミバエの雄除去法の有効性をさらに明らかにするため、本種雄および未交尾雌ならびに採卵容器を入れた室内ケージを用いて、CAR または ME 使用トラップでの雄捕獲による交尾抑制効果を比較した。その結果、CAR での捕獲は ME より交尾を強く抑制した。従って、雄除去法に用いる誘引剤としても、CAR は ME より有効である可能性が極めて高い。

本研究の有効性が挙証された場合、効果的・効率的な侵入定着防止技術として、以下のことに役立つと考えられる。

- 1 検疫で発見されるミバエ卵の確実・迅速な生死判定
- 2 セグロモミバエの実効性のある根絶防除計画策定および侵入リスクの高い地域におけるモニタリングトラップ調査の強化
- 3 我が国へのセグロモミバエ侵入時の早期発見および有効な根絶防除方法確立

Summary

Studies on Development of Effective and Efficient Techniques to Prevent the Invasion and Establishment into Japan of Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) as Economically Important Pest Insects

Toshihisa KAMIJI

The purpose of this doctoral dissertation is to establish effective and efficient techniques to prevent the invasion and establishment into Japan of fruit flies (Diptera: Tephritidae) as economically important pest insects.

The detection of dead or alive status of the fruit fly eggs present in the disinfected fruits during the Japanese import plant quarantine is a lengthy process. Therefore, for the rapid detection of the viability of disinfected eggs of fruit flies, adenosine triphosphate (ATP) assays of fruit fly eggs were conducted because it involves a shorter time period. Furthermore, this study discusses the applicability of the assays in quarantine. *Bactrocera dorsalis* were considered as an important quarantine pest insect. ATP assays were conducted on these eggs treated with low or high temperatures, including cold treatment, rapid and slow heating treatment, simulating hot water immersion treatment and vapor heat treatment, respectively. The application requirement of the assays in quarantine is that ATP concentrations in the disinfected eggs are less than those in the untreated eggs. As a result, ATP concentrations in many eggs of the cold treatment group exceeded those

in the untreated eggs. The application of ATP assays following the cold treatment in an actual quarantine condition can be difficult. The mean ATP concentrations in the eggs treated with rapid heating, thereby simulating hot water immersion treatment, were significantly decreased. There is a possibility that ATP assay could be applied to the eggs treated with hot water immersion. The mean ATP concentrations in the eggs treated with slow heating, thereby simulating vapor heat treatment, were significantly decreased. However, the mean ATP concentrations in slow heated eggs were decreased lesser than the ATP concentrations in the rapidly heated eggs. When a long time had elapsed after the treatment, the ATP concentrations in slow heated eggs may decrease further. Therefore, ATP assay may be applicable to the eggs treated with vapor heat. As a verification test for the application of the assay, it is desirable to carry out the assays of the eggs that have sustained for a long time after hot water immersion treatment or vapor heat treatment. Fruit flies and fruits distributed in the exporting country should be employed in this test.

The lower thermal threshold (T_0) and the effective cumulative temperature (K) of *Bactrocera correcta* as an important quarantine pest insect are essential parameters for the establishment of techniques of a monitoring survey and an eradication control program. Based on these parameters, the potential months of development and reproduction along with the number of annual generations at six places in Japan were estimated. The T_0 (°C) values for eggs, larvae, pupae, preoviposition, and period of one generation were 12.96, 12.17, 12.3, 14.19, and 12.91, respectively. Similarly, the K (day-degrees) values were 18.43, 72.6, 141.88, 175.7, and 418.97, respectively. The potential months of development and reproduction in Amami and Naha were from January to

December. In other words, the flies may develop and mature sexually in all months at Amami and Naha. The estimated numbers of annual generations of Amami and Naha were 7.66 and 8.85, respectively. These numbers were similar to *B. dorsalis* and *Bactrocera cucurbitae* as important quarantine pest insects. In the future, it is desirable to estimate the generation period of *B. correcta* based on the estimated T_0 and K for the development of an eradication control program based on the generation period. In addition, based on the estimated potential months of development and reproduction as well as the number of annual generations, monitoring trap surveys in the Nansei Islands should be strengthened to contribute for an early detection in case of the invasion of *B. correcta*.

It is desirable to develop an attractant that is effective in the technique of male annihilation for the eradication of *B. correcta* along with the monitoring trap survey for the early detection in case of invasion. Therefore, the sexual maturation of male *B. correcta* and age-related responses to β -caryophyllene (CAR) and methyl eugenol (ME) were examined to develop the effective attractants for *B. correcta* males. As a result, CAR attracted males before sexual maturation, whereas ME could not do that. Therefore, CAR may be an effective attractant used in the male annihilation technique for *B. correcta*. In addition, CAR strongly attracted *B. correcta* compared with ME at all ages of males. Therefore, CAR could be effective in monitoring trap surveys.

It is necessary to further clarify the effectiveness of CAR for the male annihilation technique of *B. correcta*. Therefore, suppressive effects of capturing the males in traps baited with CAR and ME on mating in *B. correcta* were compared in the laboratory cages

containing males, mature virgin females, and an egg collection device by confirming the fertilization of laid eggs. As a result, the capture of males in traps baited with CAR more strongly suppressed the mating process than that with ME. Therefore, CAR could be more effective than ME as an attractant for the male annihilation technique of *B. correcta*.

If the effectiveness of the present study is proved, then it can contribute to the following as effective and efficient technique to prevent the invasion and establishment into Japan of fruit flies as an economically important pest insects.

1. A reliable and rapid detection of the viability of fruit fly eggs detected in Japanese import plant quarantine
2. Strengthening the monitoring trap surveys in the areas with high invasion risks of *B. correcta* along with the development of effective eradication control programs of the species
3. Early detections in case of the invasion into Japan of *B. correcta* along with the establishment of effective eradication control techniques of the species

謝辞

戒能洋一博士（筑波大学生命環境系教授）には、本論文を取りまとめるにあたって終始懇切なご指導とご校閲を賜りました。ここに深甚なる感謝の意を表します。DeMar Taylor 博士（筑波大学生命環境系教授）、古川誠一博士（筑波大学生命環境系准教授）および松山茂博士（筑波大学生命環境系講師）には、論文執筆にあたり貴重なご助言とご校閲を賜りました。厚く御礼申し上げます。

西田律夫博士（京都大学名誉教授）には、セグロモモミバエの誘引剤についてご教授頂きました。深く感謝申し上げます。五十嵐亮介氏（農林水産省横浜植物防疫所）には、論文執筆に係る多大なるご支援とご協力を頂きました。心から感謝いたします。横井幸生氏（農林水産省大臣官房国際部国際経済課国際交渉官）、金田昌士氏、佐々木幹了氏、加土井仁氏、岩泉連氏、中原重仁氏、土肥野利幸氏、大村和孝氏、関本茂行博士および高西伊吹博士（農林水産省横浜植物防疫所）、松浦秀明氏（農林水産省神戸植物防疫所）、宮崎勲氏（農林水産省那覇植物防疫事務所）ならびに鶴田賢治博士および大戸謙二氏（元農林水産省横浜植物防疫所）には、本研究遂行にあたり終始ご指導を頂きました。原口大氏（沖縄県農業研究センター）および平原統氏（農林水産省横浜植物防疫所）には、セグロモモミバエの誘引剤に係る研究に取り組むきっかけを作って頂きました。荒川賢良氏（農林水産省門司植物防疫所）には、一部の実験にご協力頂きました。安達浩之氏（農林水産省那覇植物防疫事務所）、高野俊一郎博士（九州大学大学院農学研究院助教）、上松寛氏（農林水産省消費・安全局植物防疫課）および上原拓也博士（農業・食品産業技術総合研究機構研究員）

には，統計解析についてご助言を頂きました。心より感謝申し上げます。最後に，筑波大学応用動物昆虫学研究室，農林水産省消費・安全局植物防疫課および農林水産省横浜植物防疫所の皆様には，本研究遂行および論文執筆のため，豊富なご意見と多大なるご支援を頂きました。記して深謝申し上げます。

本研究の公表論文

1. 投稿論文

Kamiji T, Arakawa K, Kadoi M (2014) Effect of temperature on the development of a Vietnamese population of *Bactrocera correcta* (Bezzi) (Diptera: Tephritidae).
Japanese Journal of Environmental Entomology and Zoology 25: 101-109

Kamiji T, Kadoi M (2017) Adenosine triphosphate assay of *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) eggs treated with low or high temperatures. Applied Entomology and Zoology 52: 209-219

Kamiji T, Kaneda M, Sasaki M (2018a) Suppressive effects of trap capture on fertilized egg production in *Bactrocera correcta* (Bezzi) (Diptera: Tephritidae): comparison of two attractants, β -caryophyllene and methyl eugenol, in laboratory cages. Japanese Journal of Environmental Entomology and Zoology 29: 127-134

Kamiji T, Kaneda M, Sasaki M, Ohto K (2018b) Sexual maturation of male *Bactrocera correcta* (Diptera: Tephritidae) and age-related responses to β -caryophyllene and methyl eugenol. Applied Entomology and Zoology 53: 41-46

2. 総説, その他

Kamiji T (2012) Fruit flies (Diptera: Tephritidae) intercepted by Japanese import plant quarantine at Narita International Airport. Research Bulletin of the Plant Protection Service Japan 48: 33-42

上地俊久・金田昌士・佐々木幹了・松浦秀明・戒能洋一 (2019) 侵入が警戒され

るセグロモミバエの誘引剤に係る近年の研究の動向. 植物防疫 73: 506-

511

引用文献

- Allwood AJ, Chinajariyawong A, Drew RAI, Hamacek EL, Hancock DL, Hengsawad C, Jipanin JC, Jirasurat M, Kong Krong C, Kritsaneepaiboon S, Leong CTS, Vijaysegaran S (1999) Host plant records for fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Southeast Asia. Raffles Bulletin of Zoology Supplement 7: 1-92
- Atkinson DE (1965) Biological feedback control at the molecular level. Science 150: 851-857
- Bendall JR (1951) The shortening of rabbit muscles during rigor mortis: its relation to the breakdown of adenosine triphosphate and creatine phosphate and to muscular contraction. The Journal of Physiology 114: 71-88
- Chambers DL, Ohinata K, Fujimoto M, Kashiwai S (1972) Treating tephritids with attractants to enhance their effectiveness in sterile-release programs. Journal of Economic Entomology 65: 279-282
- Christenson LD, Foote RH (1960) Biology of fruit flies. Annual Review of Entomology 5: 171-192
- Dohino T, Mizuno T, Mizuniwa SI, Yoneda M, Miyazaki I (2014) Heat and cold tolerance of various aged eggs of *Bactrocera dorsalis* and *B. cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). Research Bulletin of the Plant Protection Service Japan 50: 63-69
- Drew RAI, Raghu S (2002) The fruit fly fauna (Diptera: Tephritidae: Dacinae) of the rainforest habitat of the Western Ghats, India. Raffles Bulletin of Zoology 50: 327-352

- Drew RAI, Romig MC (2013) Tropical fruit flies (Tephritidae: Dacinae) of South–East Asia. CAB International, UK
- Duyck PF, Sterlin JF, Quilici S (2004) Survival and development of different life stages of *Bactrocera zonata* (Diptera: Tephritidae) reared at five constant temperatures compared to other fruit fly species. Bulletin of Entomological Research 94: 89-93
- 海老名崇生・金田昌士・大村克己 (2004) ATPアッセイを利用したフラーバラゾウムシ *Pantomorus cervinus* (Boheman) 卵の生死判定. 植物防疫所調査研究報告 40: 69-73
- Ebina T, Ohto K (2007) ATP assay for determining the viability of the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) and the European red mite (*Panonychus ulmi* (Koch)) (Acari: Tetranychidae) during diapause. Applied Entomology and Zoology 42: 291-296
- FAO (2016) International standards for phytosanitary measures 26: establishment of pest free areas for fruit flies (Tephritidae). FAO, Italy
- Forney CF, Aung LH, Brandl DG, Soderstrom EL, Moss JI (1991) Reproduction of adenosine triphosphate in eggs of Fuller rose beetle (Coleoptera: Curculionidae) induced by lethal temperature and methyl bromide. Journal of Economic Entomology 84: 198-201
- Fujinami Y, Kataoka M, Matsushita K, Sekiguchi H, Itoi T, Tsuge K, Seto Y (2004) Sensitive detection of bacteria and spores using a portable bioluminescence ATP measurement assay system distinguishing from white powder materials. Journal of Health Science 50: 126-132

- 舟木康郎 (2015) 植物検疫に関する国際的枠組みの形成と機能の変遷 (I) . 植物防疫 69: 400-403
- Haq IU, Cáceres C, Meza JS, Hendrichs J, Vreysen MJB (2018) Different methods of methyl eugenol application enhance the mating success of male oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae). Scientific Reports 8: 6033
- Hee AKW, Tan KH (1998) Attraction of female and male *Bactrocera papayae* to conspecific males fed with methyl eugenol and attraction of females to male sex pheromone components. Journal of Chemical Ecology 24: 753-764
- Huang CG, Hsu JC, Haymer DS, Lin GC, Wu WJ (2009) Rapid identification of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) by loop-mediated isothermal amplification. Journal of Economic Entomology 102: 1239-1246
- IAEA (International Atomic Energy Agency) (2018) Glossary: definitions of selected words and phrases in the subject index of sterile insect technique principles and practice in area-wide integrated pest management, <https://www.iaea.org/sites/default/files/sit-glossary-updated-9-6-10.pdf>. (accessed 21 Aug 2019)
- Ikemoto T, Takai K (2000) A new linearized formula for the law of total effective temperature and the evaluation of line-fitting methods with both variables subject to error. Environmental Entomology 29: 671-682
- 池本孝哉・高井憲治 (2001) 有効積算温度法則パラメータの新しい推定法. 植物防疫 55: 311-315
- 石井象二郎・桐谷圭治・古茶武男 (1985) ミバエの根絶—理論と実際—. 農林水

産航空協会, 日本

岩橋統 (1998) メチルユーギノールの謎. 個体群生態学会会報 55: 79-86

Iwahashi O, Syamusdin-Subahar TS, Sastrodihardjo S (1996) Attractiveness of methyl eugenol to the fruit fly *Bactrocera carambolae* (Diptera: Tephritidae) in Indonesia. Annals of the Entomological Society of America 89: 653-660

Iwaizumi R, Kumagai M, Katsumata S (1994) Research of infestation to several kinds of fruits by the melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and the oriental fruit fly, *B. dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae). Research Bulletin of the Plant Protection Service Japan 30: 93-97

岩崎亘典 (2019) 深層学習を用いた病害虫識別技術の開発. 植物防疫 73: 374-380

Jiang JA, Lin TS, Yang EC, Tseng CL, Chen CP, Yen CW, Zheng XY, Liu CY, Liu RH, Chen YF, Chang WY, Chuang CL (2013) Application of a web-based remote agro-ecological monitoring system for observing spatial distribution and dynamics of *Bactrocera dorsalis* in fruit orchards. Precision Agriculture 14: 323-342

Kaneda M, Kamiji T, Sasaki M (2018) Development of ejaculatory apodeme of *Bactrocera correcta* (Bezzi) (Diptera: Tephritidae) as an indicator of male sexual maturity. Research Bulletin of the Plant Protection Service Japan 54: 73-80

桐谷圭治 (2012) 日本産昆虫, ダニの発育零点と有効積算温度定数: 第2版. 農業環境技術研究所報告 31: 1-74

気象庁 (2019) 各種データ・資料, <https://www.jma.go.jp/jma/menu/menureport.html>. (2019年7月12日閲覧)

- 熊野了州 (2015) ゾウムシ類におけるオスの性的能力に注目した不妊化技術. 植物防疫 69: 381-385
- Kumano N, Kuriwada T, Shiromoto K, Haraguchi D, Kohama T (2011) Fractionated irradiation improves the mating performance of the West Indian sweet potato weevil *Euscepes postfasciatus*. Agricultural and Forest Entomology 13: 349-356
- Liu X, Jin Y, Ye H (2013) Recent spread and climatic ecological niche of the invasive guava fruit fly, *Bactrocera correcta*, in mainland China. Journal of Pest Science 86: 449-458
- Liu X, Ye H (2009) Effect of temperature on development and survival of *Bactrocera correcta* (Diptera: Tephritidae). Scientific Research and Essays 4: 467-472
- 間瀬創・木川りか・佐野千絵 (2010) 文化財公開施設等におけるATP拭き取り検査の活用について. 保存科学 49: 1-11
- Mastrangelo T, Parker AG, Jessup A, Pereira R, Orozco-Dávila D, Islam A, Dammalage T, Walder JMM (2010) A new generation of X ray irradiators for insect sterilization. Journal of Economic Entomology 103: 85-94
- 松村正哉・大塚彰・吉松慎一 (2019) ツマジロクサヨトウの中国における分布拡大と日本への侵入警戒. 植物防疫 73: 434-438
- 中原重仁・大戸謙二・加土井仁 (2011) 人工飼料とバナナで飼育したミカンコミバエ (*Bactrocera dorsalis*) の幼虫発育期間及び産卵前期間. 植物防疫所調査研究報告 47: 37-40
- Nishida R, Tan KH, Serit M, Lajis NH, Sukari AM, Takahashi S, Fukami H (1988) Accumulation of phenylpropanoids in the rectal glands of males of the Oriental fruit

fly, *Dacus dorsalis*. *Experientia* 44: 534-536

農林水産省 (2014) 農林水産物・食品の輸出促進対策の概要,
https://www.maff.go.jp/j/shokusan/export/e_intro/pdf/2603.pdf. (2019 年 10 月 31
日閲覧)

農林水産省 (2019) ツマジロクサヨトウに関する情報,
http://www.maff.go.jp/j/syouan/syokubo/keneki/k_kokunai/tumajiro.html. (2019 年
10 月 9 日閲覧)

農林水産省植物防疫所 (2011) ポジティブリスト対象病害虫の解説. 植物防疫所
病害虫情報 95: 3-6

農林水産省植物防疫所 (2016a) ミカンコミバエ種群の緊急防除について,
<http://www.maff.go.jp/pps/j/information/kinkyuboujo/mikankomibae.html>. (2019
年 4 月 28 日閲覧)

農林水産省植物防疫所 (2016b) ミカンコミバエ発生に伴う韓国からの輸入規制
の 解 除 に つ い て ,
<http://www.maff.go.jp/pps/j/information/export/korea201611.html>. (2019 年 4 月
28 日閲覧)

農林水産省植物防疫所 (2019a) 韓国の輸入規制の解除について,
<http://www.maff.go.jp/pps/j/search/ekuni/as/korea/henko190104.html>. (2019 年 4
月 28 日閲覧)

農林水産省植物防疫所 (2019b) 告示（条件付き解禁）,
http://www.maff.go.jp/pps/j/law/houki/kokuji_joken_index.html. (2019 年 8 月 21 日
閲覧)

- 農 林 水 産 省 植 物 防 疫 所 (2019c) 植 物 検 疫 統 計 ,
<http://www.maff.go.jp/pps/j/tokei/index.html>. (2019年8月21日閲覧)
- 荻野拓海・戒能洋一・霜田政美・上原拓也・山口照美 (2018) 紫色 LED による天敵カメムシの行動制御技術. 植物防疫 72: 103-106
- Ohto K, Kaneda M, Ichinohe F (1991) Notes on the developmental period in various fruits and artificial eggging and rearing of the Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae). Research Bulletin of the Plant Protection Service Japan 27: 79-81
- 奥村正美・高木茂・井手敏和 (1981) ウリミバエの生育限界に関する調査. 植物防疫所調査研究報告 17: 51-56
- Omura K, Dohino T, Tanno M, Miyazaki I, Suzuki N (2014) Vapor heat mortality tests on the eggs of oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, infesting different fruit shape of fresh mango. Research Bulletin of the Plant Protection Service Japan 50: 1-8
- Orankanok W, Chinvinijkul S, Sawatwangkhong A, Pinkaew S, Orankanok S (2013) Methyl eugenol and pre-release diet improve mating performance of young *Bactrocera dorsalis* and *Bactrocera correcta* males. Journal of Applied Entomology 137 (s1): 200-209
- 大塚彰・松村正哉 (2018) 日本の南西諸島で誘殺されたミカンコミバエ種群の推定飛来源. 植物防疫 72: 717-721
- Phillips CB, Iline II, Novoselov M, McNeill MR, Richards NK, van Koten C, Stephenson BP (2015) Methyl bromide fumigation and delayed mortality: safe trade of live pests? Journal of Pest Science 88: 121-134

- Phillips CB, Iline II, Novoselov M, Richards NK (2014) Potential to exploit postmortem enzyme degradation for evaluating arthropod viability. *Applied Entomology and Zoology* 49: 421-428
- Phillips CB, Iline II, Richards NK, Novoselov M, McNeill MR (2013) Development and validation of a quick easily used biochemical assay for evaluating the viability of small immobile arthropods. *Journal of Economic Entomology* 106: 2006-2019
- Pradet A, Raymond P (1983) Adenine nucleotide ratios and adenylate energy charge in energy metabolism. *Annual Review of Plant Biology* 34: 199-224
- R Core Team (2019) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Austria. <https://www.r-project.org/>. (accessed 21 Aug 2019)
- Royer JE, Mayer DG (2018) Combining cue-lure and methyl eugenol in traps significantly decreases catches of most *Bactrocera*, *Zeugodacus* and *Dacus* species (Diptera: Tephritidae: Dacinae) in Australia and Papua New Guinea. *Journal of Economic Entomology* 111: 298-303
- 佐伯聰・片山満・奥村正美 (1980) ミカンコミバエの生育限界に関する調査. 植物防疫所調査研究報告 16: 73-76
- SAS Institute (2013) JMP: statistical discovery, version 11. SAS Institute, USA
- Shamsudin OM, Heather NW, Cribb B (2009) Thermosensitivity and the acquisition of thermotolerance in eggs of *Bactrocera tryoni* (Froggatt) (Diptera: Tephritidae). *Journal of Tropical Agriculture and Food Science* 37: 257-262
- Shelly TE, Edu J, Pahio E, Wee SL, Nishida R (2008) Re-examining the relationship

- between sexual maturation and age of response to methyl eugenol in males of the oriental fruit fly. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 128: 380-388
- 霜田政美 (2018) 光防除技術開発の最近の進展. *植物防疫* 72: 79-84
- Takano SI (2014) Survival of *Bactrocera latifrons* (Diptera: Tephritidae) adults under constant and fluctuating low temperatures. *Applied Entomology and Zoology* 49: 411-419
- 照屋亮・澤岨哲也・広瀬直人・牧志佑子・大城良計 (2012) 短時間温湯処理によるマンゴー炭疽病の防除. *園芸学研究* 11: 265-271
- Tokushima I, Orankanok W, Tan KH, Ono H, Nishida R (2010) Accumulation of phenylpropanoid and sesquiterpenoid volatiles in male rectal pheromonal glands of the guava fruit fly, *Bactrocera correcta*. *Journal of Chemical Ecology* 36: 1327-1334
- Tsuruta K, White IM, Bandara HMJ, Rajapakse H, Sundaraperuma SAH, Kahawatta SBMUC, Rajapakse GBJP (1997) A preliminary notes on the host-plants of fruit flies of the tribe Dacini (Diptera, Tephritidae) in Sri Lanka. *Esakia* 37: 149-160
- 梅谷献二・関口洋一・潮新一郎 (1973) ミカンコミバエの産卵能力, およびメチルオイゲノールに対する反応. *日本応用動物昆虫学会誌* 17: 63-70
- USDA (2016) Treatment manual. USDA, USA
- Vargas RI, Piñero JC, Leblanc L (2015) An overview of pest species of *Bactrocera* fruit flies (Diptera: Tephritidae) and the integration of biopesticides with other biological approaches for their management with a focus on the Pacific region. *Insects* 6: 297-318

- Vargas RI, Walsh WA, Jang EB, Armstrong JW, Kanehisa DT (1996) Survival and development of immature stages of four Hawaiian fruit flies (Diptera: Tephritidae) reared at five constant temperatures. *Annals of the Entomological Society of America* 89: 64-69
- Wang XJ (1996) The fruit flies (Diptera: Tephritidae) of the East Asian region. *Acta Zootaxonomica Sinica* 21 (Supplement): 1-419
- Weems HV Jr (1987) Guava fruit fly, *Dacus (Strumeta) correctus* (Bezzi) (Diptera: Tephritidae). *Entomology Circular* 291: 1-4
- Wee SL, Chinvinijkul S, Tan KH, Nishida R (2018) A new and highly effective male lure for the guava fruit fly *Bactrocera correcta*. *Journal of Pest Science* 91: 691-698
- White IM, Elson-Harris MM (1992) Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics. CAB International, UK
- Wong TTY, McInnis DO, Nishimoto JI (1986) Melon fly (Diptera: Tephritidae): sexual maturation rates and mating responses of laboratory-reared and wild flies. *Annals of the Entomological Society of America* 79: 605-609
- Wong TTY, McInnis DO, Nishimoto JI (1989) Relationship of sexual maturation rate to response of oriental fruit fly strains (Diptera: Tephritidae) to methyl eugenol. *Journal of Chemical Ecology* 15: 1399-1405
- Wong TTY, McInnis DO, Ramadan MM, Nishimoto JI (1991) Age-related response of male melon flies *Dacus cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) to cue-lure. *Journal of Chemical Ecology* 17: 2481-2487

横井幸生 (2016) 植物検疫のはなし：作物と緑を守る. 化学と生物 54: 762-767

吉澤治 (1993) わが国において根絶に成功したミバエ類の根絶防除事業の概要.

植物防疫 47: 527-533

Yoshizawa O (1997) Successful eradication programs on fruit flies in Japan. Research

Bulletin of the Plant Protection Service Japan 33 (Supplement): 1-10

Zhang X, Wei C, Miao J, Zhang X, Wei B, Dong W, Xiao C (2019) Chemical

compounds from female and male rectal pheromone glands of the guava fruit fly,

Bactrocera correcta. Insects 10: 78